

## **THESE**

Ecole Doctorale Biologie – Santé

Université de Lille

En vue de l'obtention du grade de

### **Docteur de l'Université de Lille**

Spécialité : Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique

---

**Stratégies thérapeutiques permettant de limiter l'agression chimique des  
xénobiotiques : ciblage du long ARN non codant DNM3OS et du récepteur à  
l'adénosine A<sub>2A</sub>**

---

Présentée et soutenue publiquement par

**Sandy Fellah**

**Le 21 mars 2023**

Membres du jury :

Madame le Docteur Nathalie THERET

Rapporteuse

Monsieur le Professeur Alexandre HERTIG

Rapporteur

Monsieur le Docteur Georges VASSAUX

Examineur

Madame le Docteur Laurence GOOSSENS

Examinatrice

Monsieur le Professeur Cyril SOBOLEWSKI

Examineur

Madame le Professeur Christelle CAUFFIEZ

Directrice de thèse



**« Dis-toi d'abord qui tu veux être, puis fais en conséquence ce que tu  
dois faire » Epictète**

*Ces travaux de recherche ont été menés en partie au sein de l'EA4483 IMPECS « Impact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine » dirigée par le Docteur Jean-Marc Lo Guidice et de l'institut Oncolille, UMR 9020 CNRS – 1277 Inserm Canther « Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies » dirigée par Isabelle Van Seuningen, équipe Sénescence, fibrose et cancer dirigée par le Pr Corinne Abbadie.*

*Cette thèse a été réalisée grâce à l'obtention d'un contrat doctoral de l'Université de Lille.*

## Remerciements

Je tiens à remercier, dans un premier temps, les membres du jury,

Le Docteur **Nathalie Théret** et le Professeur **Alexandre Hertig** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que les Docteurs **Georges Vassaux**, **Laurence Goossens** et le Professeur **Cyril Sobolewski** d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je souhaite également remercier chaleureusement ma directrice de thèse, le Professeur **Christelle Cauffiez**, pour m'avoir encadrée et m'avoir fait confiance ces cinq dernières années. Merci pour ton aide, tes conseils, ton soutien, ton dévouement à n'importe quelle heure de la journée. Je te remercie aussi pour ton écoute, ta gentillesse et ta bonne humeur.

Je remercie les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, le Docteur **Laurent Dubuquoy** et le Docteur **Georges Vassaux** pour leur écoute, leurs conseils et leur bienveillance à l'égard de ce travail.

Je tiens également à remercier :

Le Docteur **Jean-Marc Lo-Guidice** de m'avoir accueillie dans son laboratoire au cours de mes stages de Master 1 et 2, ainsi qu'au démarrage de ma thèse.

Le Docteur **Isabelle Van Seuningen** de m'avoir accueillie dans son unité ainsi que le Professeur **Corinne Abbadie** de m'avoir accueillie dans son équipe au cours de ma thèse.

Les Docteurs **Nicolas Pottier**, **Cynthia Van der Hauwaert**, **Bernard Mari**, **Michael Perrais**, **Grégoire Savary**, **Viviane Gnemmi** pour leur collaboration, disponibilité et conseils.

Je remercie **mes parents, ma sœur et ma famille** d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue durant toutes ces années. Je remercie **Barry**, de m'avoir encouragée, soutenue et d'avoir cru en moi depuis le début.

Je remercie mes collègues devenus ami **Elsa Hadj-Bachir**, **Nicolas Stoup**, **Thomas Meynard**, **Wendy Arondal** et **Félix Royer** pour leur soutien et moments de détente, de partage et de rigolade, sans oublier **Corentin De sousa** et le Docteur **Nihad Boukrout** pour leur aide, bonne humeur et sympathie.

## Résumé

L'organisme humain est constamment exposé à de nombreuses molécules présentes dans l'environnement, nommées « xénobiotiques », et regroupant des composés naturels et synthétiques, tels que des polluants environnementaux ou des médicaments. L'accumulation cellulaire de ces substances est néfaste et peut conduire à l'apparition d'effets toxiques ou de pathologies graves.

Les travaux présentés dans ce manuscrit proposent des stratégies permettant de limiter l'agression chimique des xénobiotiques dans deux contextes particuliers.

D'une part, diverses agressions chroniques, et notamment une exposition régulière à des xénobiotiques, peut induire le développement de lésions de fibrose hépatique. Sur le plan moléculaire, le TGF- $\beta$  (Transforming Growth factor  $\beta$ ) joue un rôle majeur dans l'initiation et la progression de la fibrose en facilitant le recrutement, la prolifération et l'activation des fibroblastes en myofibroblastes. Les options thérapeutiques restent limitées à l'heure actuelle. L'identification de nouvelles options thérapeutiques est donc essentielle, et l'inhibition sélective de la voie du TGF- $\beta$  dans les myofibroblastes semble être une piste pertinente. En particulier, nous avons montré dans un premier temps que l'expression hépatique du long ARN non codant DNM3OS (Dynamin 3 Opposite Strand) est induite dans deux modèles murins de fibrose hépatique (l'un chirurgical par obstruction des voies biliaires et l'autre chimique par administration de CCl<sub>4</sub>). De plus, l'administration d'un oligonucléotide anti-sens dirigé contre DNM3OS permet de réduire la sévérité des lésions de fibrose induites par l'administration de CCl<sub>4</sub>. De manière intéressante, DNM3OS est le précurseur de trois microARN matures, miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p, dont l'implication dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$  est connue. Des études *in vitro* par perte et gain de fonction ont ainsi été réalisées afin d'évaluer la contribution de chacun de ces miARN dans le processus de fibrose hépatique.

D'autre part, le cisplatine est un anti-cancéreux efficace dont l'utilisation est associée chez certains patients à l'apparition d'effets indésirables, en particulier néphrotoxiques. Nous avons montré que l'administration de cisplatine (injection(s) unique ou répétées) induit une augmentation de l'expression rénale du récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub> chez la souris. De plus,

dans un modèle de greffe syngénique, la modulation pharmacologique de ce récepteur par un antagoniste sélectif, l'istradefylline, permet de limiter les effets néphrotoxiques du cisplatine tout en préservant ses propriétés antitumorales.

Au total, ces travaux nous ont permis d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de limiter l'impact des xénobiotiques, et en particulier des médicaments, sur la santé humaine.

## Abstract

The human organism is constantly exposed to a large number of molecules, termed xenobiotics, which include both natural and synthetic compounds, such as environmental pollutants or drugs. The cellular accumulation of these compounds is harmful and can lead to the occurrence of toxic effects or serious pathologies.

This work aims at identifying strategies to limit the chemical aggression of xenobiotics in two particular contexts.

On the one hand, various chronic aggressions, and in particular chronic exposure to xenobiotics, can induce the development of liver fibrosis lesions. At the molecular level, TGF- $\beta$  (Transforming Growth factor  $\beta$ ) plays a major role in the initiation and progression of fibrosis by promoting the recruitment, proliferation and activation of fibroblasts into myofibroblasts. Currently, therapeutic options remain limited. The identification of new therapeutic options is therefore essential, and the selective inhibition of the TGF- $\beta$  pathway in myofibroblasts seems to be a relevant approach. In particular, we first showed that hepatic expression of the long non-coding RNA DN3OS (Dynamin 3 Opposite Strand) is induced in two mouse models of hepatic fibrosis (one surgical by bile duct ligation and the second chemical by CCl<sub>4</sub> administration). Moreover, the administration of an antisense oligonucleotide directed against DN3OS reduces the severity of fibrosis lesions induced by CCl<sub>4</sub> administration. Interestingly, DN3OS is the precursor of three mature microRNAs, miR-199a-5p, miR-199a-3p and miR-214-3p, known to be involved in the TGF- $\beta$  signaling pathway. *In vitro* loss- and gain-of-function studies were then performed to evaluate the contribution of each miRNA in the fibrosis process.

On the other hand, cisplatin is an effective anti-cancer drug that is associated in some patients with the development of adverse effects, in particular nephrotoxicity. We have shown that cisplatin administration (single or repeated injections) induced an increase in the renal expression of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor in mice. Moreover, in a syngeneic model, pharmacological modulation of this receptor by a selective antagonist, istradefylline, limited the nephrotoxic effects of cisplatin while preserving its antitumor properties.

Altogether, this work has allowed us to identify new therapeutic strategies to limit the impact of xenobiotics and in particular drugs on human health.

# Table des matières

Remerciements.....	5
Résumé.....	6
Abstract.....	8
Table des matières.....	10
Table des illustrations.....	14
Liste des abréviations.....	17
Publications.....	23
Avant-propos.....	24
Introduction : Impact des xénobiotiques sur la santé humaine.....	26
<b>I. Prise en charge cellulaire des xénobiotiques.....</b>	<b>28</b>
<b>1. Les réactions de phase I.....</b>	<b>28</b>
a. Généralités sur les cytochromes P450.....	29
b. Distributions cellulaire et tissulaire des CYP.....	30
c. Fonctions des cytochromes P450.....	30
d. Variabilité d'expression des cytochromes P450.....	31
<b>2. Les réactions de phase II.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Le transport de phase III.....</b>	<b>35</b>
<b>II. Exemple du tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>).....</b>	<b>36</b>
<b>1. Généralités.....</b>	<b>36</b>
<b>2. Toxicocinétique et métabolisme du CCl<sub>4</sub>.....</b>	<b>37</b>
<b>3. Hépatotoxicité.....</b>	<b>38</b>
a. Peroxydation lipidique.....	38
b. Fibrose hépatique.....	39
<b>III. Exemple du cisplatine (CisPt).....</b>	<b>41</b>
<b>1. Prise en charge cellulaire du cisplatine.....</b>	<b>42</b>
<b>2. Mode d'action du cisplatine.....</b>	<b>43</b>
a. Voie génotoxique.....	43
b. Mort cellulaire.....	44
<b>3. Effets indésirables.....</b>	<b>45</b>
a. Néphrotoxicité.....	45
b. Neurotoxicité.....	46
c. Ototoxicité.....	47
d. Hépatotoxicité.....	48
e. Toxicité gastro-intestinale.....	48

Chapitre 1 : Rôle et potentiel thérapeutique de l'ARN non codant DN3OS dans la fibrose hépatique .....	49
<b>A. Introduction</b> .....	50
<b>I. Généralités sur la fibrose tissulaire</b> .....	50
<b>1. Mécanisme général de la fibrose tissulaire</b> .....	51
a. Phase d'hémostase .....	53
b. Phase inflammatoire .....	53
c. Phase proliférative .....	54
d. Phase de remodelage .....	55
<b>2. Acteurs cellulaires du processus de fibrogenèse</b> .....	56
a. Origine des myofibroblastes .....	56
b. Activation des fibroblastes en myofibroblastes .....	58
<b>3. Acteurs moléculaires du processus de fibrogenèse</b> .....	60
a. Voie de signalisation du TGF- $\beta$ .....	60
b. Autres voies de signalisation .....	65
<b>4. Matrice extracellulaire (MEC)</b> .....	67
a. Les collagènes .....	68
b. Les protéoglycanes .....	71
c. Les glycoprotéines de structure .....	72
<b>II. La Fibrose hépatique</b> .....	74
<b>1. Aspects cliniques</b> .....	74
a. Epidémiologie .....	74
b. Diagnostic .....	75
<b>2. Mécanismes de fibrose hépatique</b> .....	77
<b>3. Réversibilité de la fibrose hépatique et solutions thérapeutiques</b> .....	79
<b>III. Les microARN</b> .....	81
<b>1. Biogenèse</b> .....	82
<b>2. Mécanisme d'action</b> .....	83
a. Le complexe RISC .....	83
b. Reconnaissance du gène cible .....	84
<b>3. Fonctions biologiques</b> .....	84
a. Mécanismes d'action .....	84
b. Rôle des miARN dans les maladies fibroprolifératives .....	86
<b>4. Cibles thérapeutiques</b> .....	88
a. Restauration de la fonction du miARN .....	90
b. Inhibition de la fonction du miARN .....	91
<b>B. Travaux personnels: Rôle du long ARN non codant DN3OS dans la fibrose hépatique</b> .....	95
<b>C. Matériel et Méthodes</b> .....	99
<b>I. Modèles animaux</b> .....	99
<b>1. Modèles murins de fibrose hépatique</b> .....	99
a. Modèle par obstruction des voies biliaires (BDL) .....	99
b. Modèle par administration de tétrachlorométhane (CCl <sub>4</sub> ) .....	100
c. Administration d'un oligonucléotide anti-sens de type GapmeR dirigé contre DN3OS dans le modèle CCl <sub>4</sub> .....	101

2. Extraction des ARN totaux (ARNt) tissulaires .....	102
3. Extraction des protéines .....	103
4. Histologie.....	103
a. Immunohistochimie .....	105
b. Coloration histologique au rouge sirius .....	104
<b>II. Modèle cellulaire .....</b>	<b>104</b>
1. Entretien des cellules .....	104
2. Stimulation au TGF- $\beta$ .....	104
3. Transfection .....	105
4. Extraction des ARN totaux (ARNt).....	105
5. Extraction des protéines .....	106
6. Immunofluorescence .....	106
<b>III. Expression des ARN et miARN d'intérêt (tissulaires et cellulaires) .....</b>	<b>107</b>
1. Rétro-transcription (RT) .....	107
2. PCR quantitative (qPCR) .....	107
3. Séquençage (RNA-seq).....	109
<b>IV. Western Blot.....</b>	<b>110</b>
1. Dosage des protéines.....	110
2. Immunoblot.....	110
<b>VI. Quantification du collagène par coloration au rouge sirius (Sircol<sup>®</sup>, Biocolor) .....</b>	<b>111</b>
1. Modèles animaux.....	111
2. Modèle cellulaire .....	111
<b>VII. RNA-FISH (RNAscope<sup>®</sup>) .....</b>	<b>112</b>
1. Modèles animaux et biopsie humaine .....	112
2. Modèle cellulaire .....	112
<b>VIII. Analyses statistiques.....</b>	<b>113</b>
<b>D. Résultats .....</b>	<b>114</b>
<b>I. Expression de DNM3OS sur une biopsie de patient atteint de fibrose hépatique .....</b>	<b>114</b>
<b>II. Modèles murins de fibrose hépatique .....</b>	<b>115</b>
1. L'obstruction des voies biliaires et l'administration de CCl <sub>4</sub> induisent des lésions de fibrose chez la souris .....	115
2. L'obstruction des voies biliaires et l'administration de CCl <sub>4</sub> induisent l'expression de DNM3OS et des microARN miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p chez la souris.....	117
3. Effets de l'administration d'un oligonucléotide anti-sens (GapmeR) dirigé contre DNM3OS dans le modèle CCl <sub>4</sub> .....	119
<b>III. Modèle cellulaire – Etude par perte et gain de fonction .....</b>	<b>120</b>
1. Effets du TGF- $\beta$ sur la lignée LX-2 .....	120
2. Effets de la perte de fonction de DNM3OS .....	122
3. Effets du gain de fonction des microARN miR-199a-5p et miR-199a-3p .....	124

4. Effets de la perte de fonction de chacun des microARN .....	126
<b>IV. Modèle cellulaire – Analyse RNA-seq</b> .....	128
1. Effets du TGF- $\beta$ .....	129
2. Effets de la surexpression des miARN miR-199a-5p et miR-199a-3p.....	130
3. Effets de l'inhibition de DN3OS $\pm$ TGF- $\beta$ .....	134
4. Cibles potentielles des miR-199a-5p et miR-199a-3p : études préliminaires.....	139
<b>E. Discussion</b> .....	140

Chapitre 2 : L'Istradefylline (KW6002), un antagoniste sélectif du récepteur A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R), limite les effets toxiques du cisplatine tout en préservant ses propriétés anti-tumorales .....

<b>I. Contexte</b> .....	147
<b>II. L'adénosine et ses récepteurs</b> .....	149
1. Adénosine .....	149
2. Récepteurs à l'adénosine A <sub>2A</sub> (A <sub>2A</sub> R).....	151
a. Généralités.....	151
b. Récepteur à l'adénosine A <sub>2A</sub> (A <sub>2A</sub> R).....	151
<b>III. Résultats</b> .....	154
1. Le Cisplatine induit des effets néphrotoxiques .....	154
2. Le KW6002 permet de limiter la toxicité rénale du cisplatine .....	154
3. Le KW6002 permet de limiter les effets neurotoxiques.....	155
4. Le KW6002 limite la néphrotoxicité et la neurotoxicité sans affecter l'efficacité anti-tumorale du cisplatine .....	155
<b>IV. Discussion</b> .....	157

Discussion générale et perspectives..... 160

**I. Evaluation des effets de l'inhibition du long ARN non codant DN3OS sur les lésions de fibrose hépatique**..... 162

**II. Evaluation des effets néphro-protecteurs induits par l'inhibition du récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R)** .....

**Bibliographie**..... 170

**Annexes**..... 215

Annexe 1 : The versatile role of miR-21 in renal homeostasis and diseases .....

Annexe 2 : Pervasive roles of the long non coding RNA DN3OS in development and diseases..

Annexe 3 : The Fibromir miR-214-3p is upregulated in Duchenne Muscular Dystrophy and promotes differentiation of human fibro-adipogenic muscle progenitors .....

Annexe 4 : Istradefylline (KW6002) protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin anti-tumor effects .....

# Table des illustrations

## I. Figures

<b>Figure 1</b> : Prise en charge cellulaire des médicaments.....	27
<b>Figure 2</b> : Mécanismes moléculaires génétiques à l'origine de variations de l'activité des EMTX.....	34
<b>Figure 3</b> : Structure chimique du CCl <sub>4</sub> .....	37
<b>Figure 4</b> : Métabolisme du CCl <sub>4</sub> .....	38
<b>Figure 5</b> : Toxicité hépatique induite par le CCl <sub>4</sub> .....	40
<b>Figure 6</b> : L'administration chronique de CCl <sub>4</sub> induit des lésions de fibrose.....	41
<b>Figure 7</b> : Structure des principaux sels de platine.....	41
<b>Figure 8</b> : Mécanismes d'action du cisplatine.....	43
<b>Figure 9</b> : L'administration chronique de cisplatine des lésions au niveau rénales.....	46
<b>Figure 10</b> : Prévalence et causes des principaux types de fibrose tissulaire.....	51
<b>Figure 11</b> : Mécanisme de fibrose tissulaire.....	52
<b>Figure 12</b> : La phase inflammatoire.....	54
<b>Figure 13</b> : La phase de prolifération.....	55
<b>Figure 14</b> : Origine des myofibroblastes.....	57
<b>Figure 15</b> : Mécanisme de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.....	60
<b>Figure 16</b> : Synthèse du TGF- $\beta$ .....	62
<b>Figure 17</b> : Voie de signalisation Smad-dépendante du TGF- $\beta$ .....	63
<b>Figure 18</b> : Voies de signalisation du TGF- $\beta$ .....	64
<b>Figure 19</b> : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.....	66
<b>Figure 20</b> : Organisation et composition de la MEC.....	68
<b>Figure 21</b> : Structure et formation des fibres de collagène.....	69
<b>Figure 22</b> : Classification, organisation, distribution et structure des différents types de collagène...	71
<b>Figure 23</b> : Composition et structure des protéoglycanes.....	72
<b>Figure 24</b> : Structure d'un monomère de fibronectine.....	73
<b>Figure 25</b> : Mécanisme de fibrose hépatique.....	78
<b>Figure 26</b> : Origine et principales propriétés des cellules fibrogéniques hépatiques.....	79
<b>Figure 27</b> : Classification des ARN non codants (ARNnc).....	81
<b>Figure 28</b> : Biogenèse des miARN.....	82
<b>Figure 29</b> : Mécanisme de dégradation de l'ARNm.....	83
<b>Figure 30</b> : Mécanismes d'action des miARN.....	85
<b>Figure 31</b> : Stratégies proposées pour le ciblage des miARN.....	90
<b>Figure 32</b> : Mécanisme d'action des GapmeR.....	92
<b>Figure 33</b> : Exemples de modifications chimiques des oligonucléotides.....	93
<b>Figure 34</b> : Exemples de stratégies visant à améliorer la distribution des ASO.....	94
<b>Figure 35</b> : Biogenèse de mir-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p à partir du transcrit primaire DNM3OS (Dynamin 3 Opposite Strand).....	95
<b>Figure 36</b> : Effet pro-fibrotique de DNM3OS dans le processus de fibrose pulmonaire.....	97
<b>Figure 37</b> : Protocole expérimental du modèle de fibrose hépatique par obstruction des voies biliaires.....	99

<b>Figure 38</b> : Modèle de fibrose hépatique par injections intrapéritonéales de CCl <sub>4</sub> .....	100
<b>Figure 39</b> : Modèle de fibrose hépatique par injections intrapéritonéales de CCl <sub>4</sub> .....	101
<b>Figure 40</b> : Protocole expérimental de l'administration curative d'un oligonucléotide antisens de type GapmeR dirigé contre DNM3OS dans le modèle de fibrose hépatique induite par administration de CCl <sub>4</sub> . ....	102
<b>Figure 41</b> : Expression de DNM3OS sur une biopsie de patient atteint de fibrose hépatique avancée et une biopsie contrôle.....	114
<b>Figure 42</b> : L'obstruction des voies biliaires et l'administration de CCl <sub>4</sub> induisent des lésions de fibrose hépatique. ....	116
<b>Figure 43</b> : L'obstruction des voies biliaires et l'administration de CCl <sub>4</sub> induisent l'expression de DNM3OS et de miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p. ....	118
<b>Figure 44</b> : L'administration de CCl <sub>4</sub> pendant trois semaines induit des lésions de fibrose. ....	119
<b>Figure 45</b> : Effets de l'inhibition de DNM3OS sur les lésions de fibrose hépatique induites par l'administration de CCl <sub>4</sub> .....	120
<b>Figure 46</b> : Effets du TGF- $\beta$ sur la lignée immortalisée de fibroblastes hépatiques (LX-2)..	121
<b>Figure 47</b> : Effets de l'inhibition de DNM3OS dans la lignée LX-2.....	123
<b>Figure 48</b> : Effets de la surexpression de miR-199-5p et miR-199a-3p dans la lignée LX-2. ....	125
<b>Figure 49</b> : Effets de l'inhibition de miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p dans la lignée LX-2 ..	127
<b>Figure 50</b> : Le traitement par les prémiR 199a-5p, 199a-3p ou le TGF- $\beta$ module l'expression de gènes dans la lignée LX-2.....	128
<b>Figure 51</b> : Sous l'effet du TGF- $\beta$ , le traitement de la lignée LX-2 par le GapmeR dirigé contre DNM3OS module l'expression de gènes.....	134
<b>Figure 52</b> : Analyse "Gene Ontology" (GO) des gènes modulés par le GapmeR DNM3OS en présence de TGF- $\beta$ . ....	137
<b>Figure 53</b> : Voies de signalisation dérégulées sous l'effet du GapmeR dirigé contre DNM3OS en présence de TGF- $\beta$ .....	138
<b>Figure 54</b> : Etude préliminaire de deux cibles potentielles des miR-199a-5p et miR-199a-3p.....	139
<b>Figure 55</b> : Mécanisme de régulation de la voie JNK par miR-344a-5p dans la fibrose pulmonaire ..	144
<b>Figure 56</b> : L'administration de Cisplatine induit une sur-expression du récepteur A <sub>2A</sub> (A <sub>2A</sub> R). ....	148
<b>Figure 57</b> : Structure de l'adénosine .....	149
<b>Figure 58</b> : Métabolisme de l'adénosine.....	150
<b>Figure 59</b> : Le récepteur A <sub>2A</sub> . ....	152
<b>Figure 59</b> : Mécanismes d'action de DNM3OS indépendant des miARN du cluster.....	165

## II. Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification des CYP en fonction de leur substrat. ....	29
<b>Tableau 2</b> : Principaux inducteurs des cytochromes P450. ....	32
<b>Tableau 3</b> : Principaux inhibiteurs médicamenteux des cytochromes P450 .....	33
<b>Tableau 4</b> : Inhibiteurs et inducteurs des principales enzymes de conjugaison.....	35
<b>Tableau 5</b> : Epidémiologie des maladies chroniques du foie dans le monde en 2016. ....	75
<b>Tableau 6</b> : Principales méthodes de scoring utilisées pour déterminer les stades de fibrose.....	76
<b>Tableau 7</b> : Panels de biomarqueurs sanguins utilisés pour déterminer les stades de fibrose.....	76
<b>Tableau 8</b> : Exemples de miARN pro-fibrotiques. ....	86
<b>Tableau 9</b> : Exemples de miARN anti-fibrotiques. ....	87
<b>Tableau 10</b> : Etudes cliniques et pré-cliniques en cours basées sur la régulation de l'expression des miARN.....	89
<b>Tableau 11</b> : Séquences des oligonucléotides antisens transfectés dans la lignée LX-2. ....	105
<b>Tableau 12</b> : Liste des essais (Taqman® gene assay) permettant la quantification des miARN.....	107
<b>Tableau 13</b> : Liste des essais (Taqman® gene assay) permettant la quantification des gènes.....	107
<b>Tableau 14</b> : Liste des amorces utilisées en chimie SYBR Green permettant la quantification de DNM3OS.....	108
<b>Tableau 15</b> : Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés .....	110
<b>Tableau 16</b> : Liste des gènes modulés par le TGF-β dans la lignée humaine de cellules stellaires LX-2..	129
<b>Tableau 17</b> : Liste des gènes modulés par les prémiR-199a-5p et prémiR-199a-3p dans la lignée humaine de cellules stellaires LX-2. ....	131
<b>Tableau 18</b> : Liste des voies canoniques dérégulées par les miR-199a-5p et miR-199a-3p. ....	1332
<b>Tableau 19</b> : Liste des maladies et fonctions biologiques pour lesquelles une dérégulation de l'expression des miR-199a-5p et miR-199a-3p est observée .....	133
<b>Tableau 20</b> : Liste des gènes modulés dans la lignée humaine de cellules stellaires (LX-2) après transfection des cellules LX-2 par un GapmeR dirigé contre DNM3OS. ....	135

## Liste des abréviations

A <sub>2A</sub> R	Récepteur A <sub>2A</sub>
AAV	Adeno-Associated Virus
ABC	ATP-Binding Cassette
ADAM	A Desintegrin Metalloprotease
ADN	Acide DésoxyriboNucléotide
ADNc	ADN complémentaire
AGO2	Argonaute 2
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AKT	protéine kinase B
ALAT	Alanine AminoTransferase
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
AMPC	AMP cyclique
APN	Amino-Peptidase N
APRI	Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index
ARN	Acide RiboNucléotide
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ARNt	ARN totaux
ASAT	Aspartate AminoTransferase
ASO	Anti-Sens Oligonucleotide
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Bak	Bcl2-homologous antagonist killer
Bax	Bcl2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BCA	BiCinchoninic acid Assay
Bcl-XL	B-cell lymphoma-eXtra-Large
BDL	Bile Duct Ligation
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin

CABLES1	Cdk5 and ABL Enzyme Substrate 1
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CAV-1	Cavéoline 1
CCBL	Cysteine S conjugate Beta Lyase
CCL	Chemokine Ligand
CCl4	Tétrachlorométhane
CD39	ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase
CD73	5'-nucléotidase
CisPt	Cisplatine
CK-1	Casein Kinase 1
CNT	Concentrative Nucleoside Transporter
CNV	CNV pour Copy Number Variation
COL1	Collagène de type I
CREB	AMPC Responsive Element Binding
CTP	Cellules Tubulaires Proximales
CTR	Copper Transporter Receptors
CYP	Cytochrome P450
D2R	Dopaminergic 2 Receptor
DAB	3,3 diaminobenzidine
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phénylindol
DCP2	Decapping mRNA 2
DGCR8	DiGeorge Critical Region 8
DEN	Di-Ethyl Nitrosamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNM3OS	Dynamin 3 Opposite Strand
DRG	Dorsal Root Ganglion
DROSHA	Drosha Ribonuclease III
ELF	Enhanced Liver Fibrosis
EMTX	Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques
EndoMT	Transition Endothélio-Mésenchymateuse
ENT	Equilibrative Nucleoside Transporter
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase

Evi	Eveness Interrupted
EXP5	Exportine 5-Ran-GTP
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin Embedded
FGF7	Fibroblast Growth Factor 7
FIB-4	Fibrosis-4
FXR	Farnesoid X Receptor
FZD	Frizzled
GAG	GlycosAminoGlycane
GGT	Gamma Glutamyl Transpeptidase
Gp	GapmeR
GSH	Glutathion
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transférase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HO-1	Hème Oxygénase 1
HRP	HorseRadish Peroxidase
HSC	Hepatic Stellate Cells
IL	Interleukine
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KIM1	Kidney Injury Molecule-1
LAP	Latent Associated Protein
LDS	Lithium Dodécyl Sulfate
LEF	Lymphoid Enhancing Factor
LKB1	Liver Kinase B1
LLC1	Lewis Lung Carcinoma 1
LNA	Locked Nucleic Acid
IncARN	Long non coding RNA
LRP	Lipoprotein Receptor-related Protein
LTBP	LTGF $\beta$ Binding Protein
LTGF $\beta$	Latency TGF- $\beta$
MALAT1	Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF	Maladies Chroniques du Foie
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
miARN	microARN
MMP	Matrix Metalloproteinase
MMR	Mismatch Repair
MRE	miRNA Responsive Element
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Non Alcoholic SteatoHepatitis
NER	Nucleotide Excision Repair
NFS	Nonalcoholic Fatty liver disease Fibrosis score
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
Nrf2	Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2
NSCLC	Non-Small Cell Lung Carcinoma
Nt	Nucléotides
OCT2	Organic Cation Transporter 2
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGDFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
Pg-P	glycoprotéine-P
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PXR	Pregnane X Receptor
qPCR	PCR quantitative
RIPA	RadiolImmunoPrecipitation Assay buffer
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA-FISH	RNA Fluorescence In Situ Hybridization
RNase H	Ribonuclease H

ROCK	RhO-associated protein Kinase
ROS	Espèces Réactives à l'Oxygène
RT	Rétro-Transcription
SBE	Smad Binding Element
SEM	Standard Error of the Mean
siARN	Small Interfering RNA
SIRT1	Sirtuine 1
SLC	Solute Carrier
SMURF	Smad Ubiquitin Regulatory Factor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SV40	Simian Virus 40
TAK1	Transforming growth factor beta-Activated Kinase
TBST	Tris-Buffered Saline / Tween
TCF	T-cell Factor
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF- $\alpha$	Transforming Growth factor $\alpha$
TGF- $\beta$	Transforming Growth factor $\beta$
TGF $\beta$ R	Récepteur au TGF- $\beta$
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNFR1	Récepteur 1 au TNF $\alpha$
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor – alpha
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
TRBP	Transactivation response element RNA-Binding Protein
TSB	Target Site Blocker
TSP-1	Thrombospondine-1
UDP	Uridine Di-Phosphate
UTP	Uridine Tri-Phosphate
UTR	Untranslated Transcribed Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Veh	Véhicule
XRN1	exoribonucléase 1
ZO-1	Zonula Occludens-1
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ Smooth Muscle Actin

# Publications

## I. Articles de recherche

1. Dewaeles E\*, Carvalho K\*, **Fellah S\***, Sim J, Boukrout N, Caillierez C, Ramakrishnan H, Van der Hauwaert C, Vijayashankara J, Martin N, Massri N, Launay A, Folger JK, De Schutter C, Larrue R, Loison I, Goujon M, Jung M, Le Gras S, Gomez-Murcia V, Faivre E, Lemaire J, Garat A, Beauval N, Maboudou P, Gnemmi V, Gibier JB, Buée L, Abbadie C, Glowacki F, Pottier N, Perrais M, Cunha RA, Annicotte JS, Laumet G, Blum D, Cauffiez C. **Istradefylline (KW6002) protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin anti-tumor effects.** *J Clin Invest.* 2022 ; 132(22) : e152924.
2. Goujon M, Woszczyk J, Gaudelot K, Swierczewski T, **Fellah S**, Gibier JB, Van Seuningem I, Larrue R, Cauffiez C, Gnemmi V, Aubert S, Pottier N, Perrais M. **A Double-Negative Feedback Interaction between miR-21 and PPAR- $\alpha$  in Clear Renal Cell Carcinoma.** *Cancers (Basel).* 2022 ;14(3) : 795.
3. Arrighi N, Moratal C, Savary G, Fassy J, Nottet N, Pons N, Clément N, **Fellah S**, Larrue R, Magnone V, Lebrigand K, Pottier N, Dechesne C, Vassaux G, Dani C, Peraldi P, Mari B. **The Fibromir miR-214-3p is upregulated in Duchenne Muscular Dystrophy and promotes differentiation of human fibro-adipogenic muscle progenitors.** *Cells.* 2021 ; 10 : 1832.

## II. Revues

1. Larrue R\*, **Fellah S\***, Van der Hauwaert C, Hennino MF, Perrais M, Lionet A, Glowacki F, Pottier N, Cauffiez C. **The versatile role of miR-21 in renal homeostasis and diseases.** *Cells.* 2022 ; 11 : 3525.
2. **Fellah S\***, Larrue R\*, Truchi M, Vassaux G, Mari B, Cauffiez C, Pottier N. **Pervasive roles of the long non coding RNA DNM3OS in development and diseases.** *WIRE's RNA.* 2022 ; e1736.

## Communications orales

1. **Fellah S**, De Sousa C, Boukrout N, Van der Hauwaert C, Pottier N, Cauffiez C. **Role and therapeutic potential of the long non coding RNA DNM3OS in liver fibrosis**. ONCOLille seminar. Lille ; 02 Juin 2022.
2. **Fellah S**, De Sousa C, Savary G, Van der Hauwaert C, Pottier N, Cauffiez C. **Role and therapeutic potential of the long non coding RNA DNM3OS in liver fibrosis**. Canther PhD Day. Lille ; 18 mars 2021.
3. **Fellah S**, De Sousa C, Savary G, Van der Hauwaert C, Pottier N, Cauffiez C. **Role and therapeutic potential of the long non coding RNA DNM3OS in liver fibrosis**. Drug Discovery Day. Lille ; 16 décembre 2020.
4. Lionet A, Hamroun A, **Fellah S**, Mentaverri R, Zaworski J, Gnemmi V, Gibier J.B, Cauffiez C, Louvet A, Glowacki F. **Hypophosphatémie induite par la production de FGF23 au cours des hépatites aiguës : une démonstration de la clinique à la pailleasse**. Congrès de la SFNDT. Liège ; le 5 octobre 2022.

## Communications affichées (posters)

1. **Fellah S**, Dewaeles E, Carvalho K, Boukrout N, Van der Hauwaert C, Martin N, Vijayashankara, Gnemmi V, Pottier N, Perrais M, Blum D, Cauffiez C. **Istradefylline (KW6002) protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving anti-tumoral effects**. Oncolille days. Lille ; 02 – 04 novembre 2022.
2. **Fellah S**, De Sousa C, Boukrout N, Van der Hauwaert C, Pottier N, Cauffiez C. **Potentiel thérapeutique du ciblage de l'ARN non codant DNM3OS dans la fibrose hépatique, facteur de risque de l'hépatocarcinome**. Cancéropôle nord-ouest. Deauville ; 04-06 mai 2022. Sélectionnée pour un flash-talk.
3. **Fellah S**, De Sousa C, Savary G, Van der Hauwaert C, Pottier N, Cauffiez C. **Role and therapeutic potential of the long non coding RNA DNM3OS in liver fibrosis**. RNA. Nice ; 16-18 mars 2022. Sélectionnée pour un flash-talk.
4. **Fellah S**, De Sousa C, Savary G, Van der Hauwaert C, Pottier N, Cauffiez C. **Rôle et potentiel thérapeutique de l'ARN non codant dans la fibrose hépatique et l'hépatocarcinome**. Cancéropôle nord-ouest. Deauville ; 13-15 octobre 2021. Sélectionnée pour un flash-talk.

## Avant-propos

L'Homme est continuellement exposé à un grand nombre de composés, naturels ou de synthèse, appelés « xénobiotiques ». Une exposition prolongée aux xénobiotiques peut être à l'origine d'effets néfastes conduisant à des effets toxiques voire à l'apparition de pathologies graves. A titre d'exemple, une exposition répétée à des polluants environnementaux tels que le paraquat, un herbicide encore largement utilisé au niveau mondial, est à l'origine du développement d'une fibrose pulmonaire (Khodayar *et al.*, 2014). La consommation de médicaments peut, quant à elle, également conduire à l'apparition d'effets indésirables chez certains patients. Ainsi, la consommation régulière de paracétamol, l'un des médicaments les plus utilisés pour ses propriétés analgésiques et antipyrétiques, est à l'origine de l'apparition d'une nécrose hépatocellulaire conduisant à une insuffisance hépatique aigüe (Lee, 2017). On observe également chez certains patients sous chimiothérapie (tels que les sels de platine), des effets indésirables graves au niveau hépatique ou au niveau rénal (Lowenthal and Eaton, 1996; Tao *et al.*, 2020). De plus, la réponse d'un individu à des doses conventionnelles d'un médicament peut être variable et peut conduire chez certains à la modification d'un traitement efficace (limitation des doses, arrêt du traitement) (Edwards and Aronson, 2000). Il est donc essentiel de connaître le devenir cellulaire des xénobiotiques et d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette réponse aux xénobiotiques.

Depuis la découverte de la molécule d'ADN en 1953 par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953), la compréhension du génome humain et d'autres organismes vivants s'est considérablement développée ces dernières décennies. Bien que les trois quarts du génome humain soient transcrits en ARN, seulement environ 3% codent pour des protéines (Kimura, 2020). L'essor des méthodes de séquençage à haut débit et de nouvelle génération ont permis de mettre en évidence de nouvelles classes d'ARN non codants (Andersen *et al.*, 1987; Lee, Feinbaum and Ambros, 1993). On distingue ainsi, selon leur taille, les petits ARN non codants (de taille <50 nucléotides) dont font partie les microARN, les ARN non codants de taille moyenne (entre 50 et 200 nucléotides) et les long ARN non codants (de taille > 200 nucléotides) (Esteller, 2011). Nous savons désormais que les ARN non codants jouent un rôle

primordial dans la régulation de l'expression des gènes et que leur dérégulation induit des pathologies chez l'Homme. Par conséquent, les ARN non codants peuvent présenter un intérêt en tant que marqueurs biologiques pronostiques ou diagnostiques. De plus, grâce aux progrès technologiques réalisés, il est désormais possible d'envisager le ciblage thérapeutique des ARN non codants (Matsui and Corey, 2017).

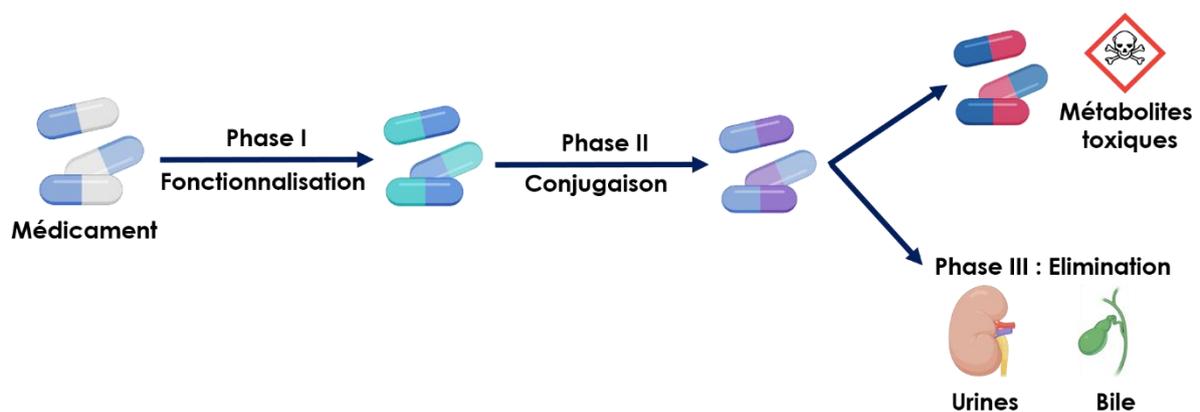
Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette thématique générale et ce manuscrit est organisé en deux grandes parties. **Une première partie introductive s'efforce de présenter la prise en charge cellulaire des xénobiotiques** et en particulier de deux composés, le tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>), induisant des lésions de fibrose hépatique et le cisplatine, un anti-cancéreux responsable d'effets indésirables fréquents. La seconde partie est divisée en deux chapitres de travaux personnels. Le premier consiste à évaluer **le rôle et le potentiel thérapeutique d'un long ARN non codant polycistronique, DNM3OS (Dynamin 3 Opposite Strand), dans le contexte de la fibrose hépatique**, en s'appuyant principalement sur un modèle murin (administration de CCl<sub>4</sub>). Quant au second chapitre, il concerne **l'implication du récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R) dans les effets indésirables induits par le cisplatine**. L'ensemble de ces travaux ont en partie été réalisés au sein de l'EA4483 IMPECS « Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine », dirigée par le Dr Jean-Marc Lo Guidice, puis au sein de l'UMR 9020 CNRS – 1277 Inserm Canther « Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies », dirigée par le Dr Isabelle Van Seuningen dans l'équipe « Sénescence, fibrose et cancer » (Pr Corinne Abbadie).

## **Introduction : Impact des xénobiotiques sur la santé humaine**

---

Les composés que nous ingérons, respirons et de manière plus générale, ceux avec lesquels nous sommes en contact peuvent, conduire à l'apparition d'effets toxiques ou de pathologies graves chez l'Homme. En effet, l'organisme humain est constamment exposé à un grand nombre de composés, regroupés sous le terme « xénobiotiques », tels que des composés naturels, médicamenteux ou polluants atmosphériques (Johnson *et al.*, 2012).

Des systèmes enzymatiques puissants, capables d'effectuer un large spectre de réactions chimiques, se sont développés au cours de l'évolution afin de réaliser la détoxification d'une partie de ces composés et de favoriser leur élimination dans les fluides biologiques (Bohnert *et al.*, 2016). En effet, ces molécules, généralement hydrophobes, ont tendance à s'accumuler dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires et peuvent entraîner la mort cellulaire (Parkinson, 1996). Les processus de détoxification se déroulent généralement en trois phases, mettant en jeu différentes protéines regroupées sous le terme d'Enzymes du Métabolisme et Transporteurs des Xénobiotiques (EMTX) : les enzymes de phase I (dites de fonctionnalisation) et de phase II (dites de conjugaison), ainsi que des protéines de phase III, représentées par des transporteurs (Dekant, 2009) (**Figure 1**). Cependant, dans certains cas, ces réactions de métabolisation conduisent à la formation de composés plus réactifs voire plus toxiques, susceptibles d'entraîner ainsi des effets délétères (Testa and Krämer, 2007 ; Testa and Krämer, 2009).



**Figure 1 : Prise en charge cellulaire des médicaments.** Le processus de détoxification des médicaments se déroule en trois phases : la phase I (dite de fonctionnalisation), la phase II (dite de conjugaison) et la phase III (dite d'élimination). Cependant, dans certains cas, les métabolites formés sont plus toxiques que le médicament administré et peuvent être à l'origine d'effets indésirables.

## I. **Prise en charge cellulaire des xénobiotiques**

L'étude du métabolisme des médicaments s'est surtout développée après la parution du livre «Detoxication Mechanisms» par Williams dans les années 50 (Williams, 1947; Testa, Pedretti and Vistoli, 2012). La connaissance et la détection des composés issus du métabolisme et du transport des médicaments constituent une étape indispensable au cours des phases de recherche et développement de nouveaux médicaments, et en particulier en phase pré-clinique (Tang and Lu, 2010; Orhan, 2021). Les nombreuses études réalisées afin d'évaluer les conséquences pharmacologiques et toxicologiques des EMTX (Ding and Kaminsky, 2003; Orhan, 2021) ont ainsi permis d'améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine de la formation de métabolites de composés environnementaux et de médicaments potentiellement toxiques.

### 1. **Les réactions de phase I**

Les réactions de phase I permettent l'introduction d'une fonction chimique supplémentaire, et produisent des métabolites de polarité supérieure, et donc plus réactifs. Ces réactions, dites de fonctionnalisation, sont principalement catalysées par les membres de la superfamille des cytochromes P450 (CYP). Ainsi, parmi les deux cents médicaments les plus prescrits, près de 75% sont métabolisés par les CYP (Rendic and Guengerich, 2015). D'autres enzymes, notamment les flavines mono-oxygénases, mono-amine oxydases, alcool déshydrogénases ou encore aldo-céto-réductases, participent également aux réactions de phase I mais de manière minoritaire (Rendic, 2002; Rendic and Guengerich, 2015; M. Zhao *et al.*, 2021).

Les réactions de phase I produisent des métabolites réactifs qui pourront alors être pris en charge par des enzymes de phase II afin d'être désactivés et éliminés. Cependant, dans certains cas, les réactions de phase I génèrent des métabolites réactifs et toxiques. En effet, certains métabolites très électrophiles réagissent facilement avec les macromolécules cellulaires nucléophiles (ADN, protéines) entraînant une perturbation de l'homéostasie cellulaire et une cytotoxicité (Holtzman, 1982; Park *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2021).

### a. Généralités sur les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) ont été identifiés pour la première fois par Martin Klingenberg en 1958 (Klingenberg, 1958). Il a fallu attendre les années 1970, pour que Cooper et al., mettent en évidence leur rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques (Cooper, Schleyer and Rosenthal, 1970). Au cours de l'évolution des espèces, les CYP ont acquis, à partir d'un gène ancestral, un grand degré de diversité leur permettant de métaboliser de nombreux composés de structures chimiques différentes (Nelson *et al.*, 1993). A ce jour, 57 CYP humains ont été identifiés et sont classés en familles et sous-familles selon leur homologie de séquence en acides aminés (Nebert and Gonzalez, 1987). Ainsi, selon cette nomenclature, une famille est désignée par un chiffre arabe (par exemple CYP**3**) et deux membres d'une même famille présentent une homologie de séquence d'au moins 40 %. Les différentes familles sont subdivisées en sous-familles, désignées par une lettre majuscule (par exemple CYP**3A**). Les CYP d'une même sous-famille présentent, quant à eux, une homologie de séquence supérieure à 55%. Enfin, chaque isoenzyme est répertoriée par un chiffre (par exemple CYP**3A4**) (Nelson *et al.*, 1996).

Les CYP participent au métabolisme oxydatif de substances exogènes mais sont également nécessaires à la production d'un large spectre de composés endogènes, dont le cholestérol, les stéroïdes, les prostaglandines ou encore les acides biliaires (Nebert and Russell, 2002; Lynch and Price, 2007). Le métabolisme des médicaments est, quant à lui, principalement réalisé par les membres des familles CYP1, CYP2 et CYP3 (Ingelman-Sundberg, 2004; Rendic and Guengerich, 2015; M. Zhao *et al.*, 2021) (**Tableau 1**).

**Tableau 1 : Classification des CYP en fonction de leur substrat.**

Stérols	Xénobiotiques	Acides gras	Eicosanoïdes	Vitamines	Autres
1B1, 7A1, 7B1, 8B1, 11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1, 21A2, 27A1, 39A1, 46A1, 51A1	1A1, 1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 3A4, 3A5, 3A7, 3A43	2J2, 2U1, 4A11, 4B1, 4F11, 4F12, 4V2	4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1	2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1, 27C1	2A1, 2S1, 2W1, 4A22, 4F22, 4X1, 4Z1, 20A1

D'après Guengerich, 2015.

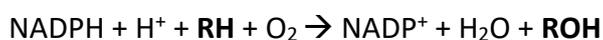
### **b. Distributions cellulaire et tissulaire des CYP**

Quantitativement, les CYP sont principalement exprimés au niveau hépatique, en particulier les membres de la famille CYP3 (Zanger and Schwab, 2013a; Achour, Barber and Rostami-Hodjegan, 2014). Les CYP sont cependant présents dans tous les tissus, surtout ceux présents à l'interface entre l'environnement et l'organisme, dont les poumons, l'intestin grêle, les reins ou la peau (Seliskar and Rozman, 2007). En revanche, leur expression est très faible voire nulle dans les globules rouges, les os et les muscles lisses (Ding and Kaminsky, 2003; Achour, Barber and Rostami-Hodjegan, 2014; Almazroo, Miah and Venkataramanan, 2017). Les CYP présentent un profil d'expression tissulaire variable, certaines isoformes pouvant être spécifique d'un tissu. Ainsi, dans les tissus où ils sont exprimés, les CYP modulent la biodisponibilité des médicaments et contribuent à la formation de métabolites, dont la production *in situ* peut expliquer leur toxicité spécifique dans certains organes (Ding and Kaminsky, 2003).

Au niveau cellulaire, la majorité des CYP sont localisés dans les membranes du réticulum endoplasmique. Certains d'entre eux sont exprimés au niveau de la membrane mitochondriale (Peter Guengerich, Waterman and Egli, 2016).

### **c. Fonctions des cytochromes P450**

Les CYP catalysent en premier lieu des réactions de mono-oxygénation grâce à l'oxygène atmosphérique, en introduisant un groupement polaire, permettant ainsi d'activer leurs substrats (**RH**) (Testa, Pedretti and Vistoli, 2012), selon la réaction bilan suivante :



Les CYP sont associés à des chaînes de transfert d'électrons distinctes en fonction de leur localisation cellulaire. Pour les CYP du réticulum endoplasmique, il s'agit d'une NADPH-cytochrome P450 réductase. Pour les cytochromes mitochondriaux, la chaîne de transfert d'électrons comporte, en plus d'une réductase à flavine, la ferrédoxine (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). Par ailleurs, les CYP sont également capables de catalyser d'autres types de réaction dont des désaturations, déalkylations, hydroxylations, époxydations, déarylations, déaromatisations et isomérisations (Guengerich, 2001).

#### **d. Variabilité d'expression des cytochromes P450**

De nombreux facteurs environnementaux et génétiques modulent l'expression et / ou l'activité des CYP.

##### *i. Facteurs physiologiques et pathologiques*

L'expression des CYP évolue constamment au cours de la vie (Kinirons and O'Mahony, 2004; Stevens *et al.*, 2008). Physiologiquement, les sujets âgés se distinguent par une diminution de leurs fonctions rénale et hépatique (Tajiri and Shimizu, 2013; Fang *et al.*, 2020), ainsi qu'une expression globale plus faible des enzymes de phase I (Yun *et al.*, 2010). De plus, bien que l'activité des CYP soit inférieure chez le fœtus par rapport à l'homme adulte (Hines and McCarver, 2002), certaines isoformes sont exclusivement fœtales. Par exemple, le CYP3A7, est une isoenzyme exprimée uniquement dans le foie fœtal et pouvant représenter plus de 30% de l'ensemble des CYP hépatiques du fœtus (Stevens *et al.*, 2003). De plus, les CYP seraient affectés par un dimorphisme sexuel. En effet, Wolbold *et al.*, ont montré que le CYP3A4, qui métabolise la plupart des médicaments, est deux fois plus exprimé chez la femme que chez l'homme (Wolbold *et al.*, 2003).

Par ailleurs, certains états pathologiques sont associés à une variabilité d'expression des CYP. En effet, l'insuffisance hépatique, des infections ou encore l'inflammation induisent généralement une diminution de l'activité des CYP (Slaviero, Clarke and Rivory, 2003). En revanche, des maladies, comme le diabète, entraînent la surexpression de certains CYP dont les CYP2E1 et CYP3A4 (Arinç, Arslan and Adali, 2005; Hu *et al.*, 2014).

##### *ii. Facteurs environnementaux*

L'expression et l'activité des CYP peuvent également varier suite à l'exposition de l'organisme à certains composés chimiques, tels que des xénobiotiques ou des facteurs endogènes (Zanger and Schwab, 2013b).

L'induction de l'expression des CYP par des xénobiotiques, et en particulier les médicaments, fait principalement intervenir un mécanisme transcriptionnel, en engageant des récepteurs nucléaires tels que AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) (Bock, 2019), PXR (Pregnane X Receptor)

et CAR (Constitutive Androstane Receptor) (Wang *et al.*, 2012a) (**Tableau 2**). D'autres mécanismes post-transcriptionnels sont également impliqués, en particulier la stabilisation d'ARN messagers (ARNm) et de protéines (Pelkonen *et al.*, 2008).

L'induction des CYP peut ainsi entraîner des répercussions sur les effets de certains médicaments. En effet, l'induction des CYP peut faciliter l'élimination des médicaments et donc diminuer leurs effets thérapeutiques. A titre d'exemple, la rifampicine, inducteur du CYP3A4, conduit au métabolisme accru de la méthadone, métabolisée par ce CYP, menant à une diminution de ses effets analgésiques (Holmes, 1990). En revanche, lorsqu'un médicament est administré sous forme de pro-drogue et nécessite donc une activation métabolique, l'induction des CYP peut entraîner des effets thérapeutiques accrus et potentiellement toxiques (Pelkonen *et al.*, 2008).

**Tableau 2 : Principaux inducteurs des cytochromes P450.**

Enzymes	Inducteurs	Récepteurs nucléaires
CYP1A	Inhibiteurs de la pompe à proton, antibiotiques, anti-épileptiques, anti-rétroviraux, barbituriques, immunosuppresseurs	AHR, CAR et PXR
CYP2A	Anti-épileptiques, anti-paludéens, anti-rétroviraux, barbituriques, oestrogènes	CAR, PXR et ER
CYP2B	Antibiotiques, anti-épileptiques, anti-paludéens, analgésiques, anti-rétroviraux, barbituriques	CAR et PXR
CYP2C	Antibiotiques, anti-épileptiques, anti-androgènes, anti-émétiques, anti-rétroviraux, barbituriques, inhibiteurs de la protéine kinase, antagonistes du récepteur à l'endothéline, anti-paludéens	CAR et PXR
CYP2E	Antibiotiques, modulateurs du récepteur de l'acide rétinoïque	RXR
CYP3A	Anti-androgènes, antibiotiques, anti-diarrhéiques, anti-émétiques, anti-épileptiques, anti-paludéens, agents néoplasiques, analgésiques, anti-rétroviraux, barbituriques, dérivés d'acides biliaires, antagonistes du récepteur à l'endothéline, glucocorticoïdes, inhibiteurs de la protéine kinase, simulants, inhibiteurs de la synthèse des stéroïdes	CAR, PXR, GR

D'après Hakkola *et al.*, 2020. AHR = Aryl Hydrocarbon Receptor ; CAR = Constitutive Androstane Receptor ; ER = Estrogen Receptor ; GR = Glucocorticoid Receptor ; PXR = Pregnane X Receptor ; RXR = Retinoid X Receptor.

Par ailleurs, d'autres xénobiotiques entraînent l'inhibition des CYP en bloquant leur activité de façon réversible ou irréversible (**Tableau 3**). L'exemple le plus documenté concerne l'inhibition du CYP3A4 par des composés du jus de pamplemousse, un processus conduisant à

des effets iatrogènes, notamment suite à la prise d’anti-vitamines K (anti-coagulants) ou de certains antibiotiques (Zhou, 2008; Maffioletti, 2015). L’inhibition des CYP peut limiter l’élimination des médicaments, conduire à leur accumulation et augmenter ainsi leurs effets potentiellement toxiques (Lin and Lu, 1998). Par exemple, la co-administration de terfenadine (un substrat du CYP3A4) et de kétoconazole (un inhibiteur du CYP3A4) est associée à des torsades de pointe, potentiellement fatales chez certains patients (Rajput, Singh and Sharma, 2010). A l’inverse, dans le cas des pro-médicaments, l’inhibition des CYP peut être à l’origine d’une inefficacité thérapeutique (Lin and Lu, 1998). Par exemple, la codéine nécessite d’être activée en morphine par le CYP2D6. Une inhibition du CYP2D6 par la quinidine entraîne alors une diminution des effets analgésiques attendus (Wilder-Smith, Hufschmid and Thormann, 1998).

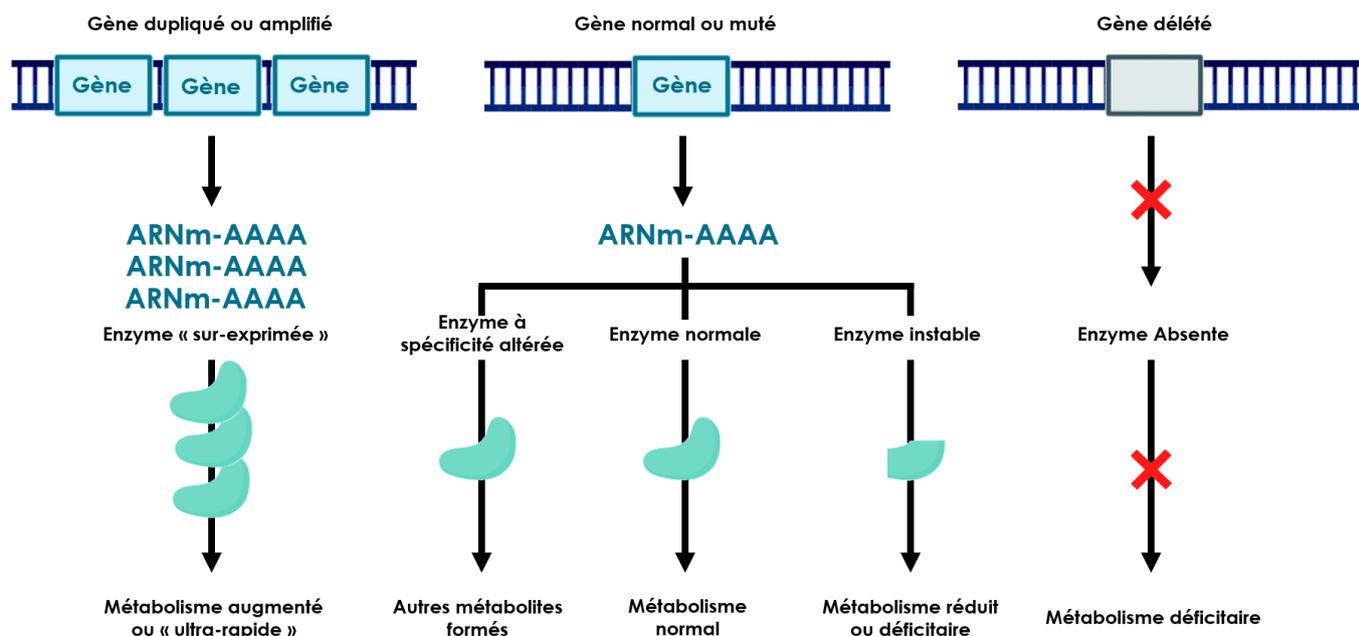
**Tableau 3 : Principaux inhibiteurs médicamenteux des cytochromes P450**

Enzyme	Inhibiteurs
CYP1A2	Amiodarone, cimétidine, ciprofloxacine, fluvoxamine
CYP2C9	Amiodarone, fluconazole, fluoxétine, métronidazole, ritonavir, triméthoprim/sulfaméthoxazole
CYP2C19	Fluvoxamine, isoniazide, ritonavir
CYP2D6	Amiodarone, cimétidine, diphenhydramine, fluoxétine, paroxétine, quinidine, ritonavir, terbinafine
CYP3A4 et CYP3A5	Clarithromycine, diltiazem, erythromycin, itraconazole, kétoconazole, nefazodone, ritonavir, verapamil

D’après Lynch and Price, 2007 et Flockhart *et al.*, 2021.

### *iii. Facteurs génétiques et épigénétiques*

Les différences inter-individuelles de réponse à un composé chimique observées peuvent également s’expliquer en partie par le fait que les gènes codant les CYP sont hautement polymorphes (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007; Sim and Ingelman-Sundberg, 2013). A titre d’exemple, près de 700 allèles de cytochromes P450, présentant un impact fonctionnel, ont été décrits (<https://www.pharmvar.org/>). En effet, la présence de mutations affectant la séquence des CYP peut entraîner la synthèse d’une protéine présentant une activité réduite, augmentée ou nulle (**Figure 2**). Les bases moléculaires à l’origine de variations d’expression et / ou d’activité de ces protéines sont d’ores et déjà en partie élucidées. Il s’agit de micro-lésions de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ou de macro-lésions de type variation du nombre de copies de gènes (CNV pour Copy Number Variation) (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007)



**Figure 2 : Mécanismes moléculaires génétiques à l'origine de variations de l'activité des EMTX.** D'après Ingelman-Sundberg, Oscarson and McLellan, 1999.

D'autres phénomènes de type épigénétique sont également susceptibles de moduler le niveau d'expression des CYP. Il s'agit surtout des mécanismes de régulation de l'expression des gènes mettant en jeu des microARN (miARN) ou par méthylation de l'ADN (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007 ; Ramamoorthy et Skaar, 2011). Ces derniers mécanismes pourraient avoir une pertinence toute particulière pour les gènes présentant des variations inter-individuelles d'expression mais pour lesquels aucune variation de séquence n'a été identifiée dans leurs régions codantes, promoteurs ou sites consensus d'épissage.

## 2. Les réactions de phase II

Les réactions de phase II, dites de conjugaison, permettent généralement de transférer un radical hydrophile (sur le produit de réaction de phase I) pour permettre l'élimination des composés dans les urines et/ou les acides biliaires (Rendic and Guengerich, 2015). Certains composés sont directement conjugués, sans étape de fonctionnalisation préalable. La phase II regroupe majoritairement des réactions de glucuronidation (dans 40 à 70% des cas), de sulfatation (Wang *et al.*, 2005) et d'acétylation (Kukongviriyapan *et al.*, 2006). D'autres groupements, comme le glutathion peuvent également être transférés par une glutathion S-transférase (Saito, Zwingmann and Jaeschke, 2010).

L'expression des enzymes de phase II peut être également affectée par certains médicaments exerçant des effets inhibiteurs ou inducteurs (**Tableau 4**) (Almazroo, Miah and Venkataramanan, 2017).

**Tableau 4 : Inhibiteurs et inducteurs des principales enzymes de conjugaison.**

Enzymes	Groupements transférés	Inhibiteurs	Inducteurs
UDP-glucuronyltransférase	Acide glucuronique	Paclitaxel, midazolam, cyclosporine A, ketoconazole, phenobarbital, phénytoïne	Bilirubine, phenobarbitone, rifampicine
Sulfonyltransférase	Groupement sulfate	Flavonoïdes, acide méfénamique, acide salicylique, clomifène, danazol	Acide rétinoïque, méthotrexate
N-acétyltransférase	Groupement acétyl	Quercétine, scopolétine, coumarine	Androgènes, aminophylline
Gluthation S-transférase	Gluthation	Phénols, quinones, dérivés de la vitamine C, dopamine, acide trans-rétinoïques	

D'après Almazroo, Miah and Venkataramanan, 2017.

### 3. Le transport de phase III

Les protéines de phase III assurent essentiellement le transport actif des xénobiotiques hydrophiles et des conjugués de phase II hors de la cellule (Gerloff, 2004; Murakami and Takano, 2008; Döring and Petzinger, 2014). Les transporteurs des xénobiotiques regroupent des membres des superfamilles SLC (Solute Carrier) et ABC (ATP-Binding Cassette). Les transporteurs SLC et ABC assurent l'influx et l'efflux de substances endogènes et / ou exogènes au niveau de la membrane plasmique, grâce à différents modes de transport. Ils se situent au niveau des faces apicales ou basolatérales des cellules, et permettent d'excréter les composés conjugués dans la circulation sanguine, la lumière intestinale, la bile ou l'urine (Kimura *et al.*, 2007; Döring and Petzinger, 2014). La superfamille des SLC compte actuellement plus de 400 membres (458 gènes) regroupés en 65 sous-familles SLC1 à SLC65 (<https://www.bioparadigms.org/>). La superfamille des ABC, quant à elle, compte 7 sous-familles (ABCA et ABCG) regroupant 49 membres (Vasiliou, Vasiliou and Nebert, 2009). Actuellement, 89 gènes de transporteurs clairement impliqués dans le transport de xénobiotiques ont été identifiés chez l'homme, tous membres des superfamilles SLC ou ABC (Kim, 2002; Sweet, 2005; Deeley and Cole, 2006). Parmi les transporteurs ABC, la

glycoprotéine-P (Pg-P), codée par le gène *ABCB1*, est le transporteur membranaire le mieux documenté à l'heure actuelle en raison de son rôle majeur dans la biodisponibilité des xénobiotiques chez l'être humain (Juliano and Ling, 1976; Schwab *et al.*, 2003). La glycoprotéine-P est fortement exprimée, notamment dans les reins, le foie, le cerveau, l'intestin, le placenta et les cellules sanguines (Thiebaut *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1990; Bleasby *et al.*, 2006). La Pg-P possède un large spectre de substrats de structures variées et le plus souvent de nature hydrophobe et amphotère (Shapiro *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000). Par ailleurs, les transporteurs suscitent un intérêt croissant. En effet, en diminuant la quantité de médicament présente dans les cellules, ils peuvent être responsables de résistances multiples, notamment dans le cadre de l'administration d'agents anti-cancéreux (Shustik, Dalton and Gros, 1995; Sharom, 2008; Abraham, Salama and Azab, 2015).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet de deux xénobiotiques et à leur retentissement en termes de toxicité. Il s'agit d'une part du tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>) qui induit des lésions de fibrose hépatique. Ce composé est ainsi largement utilisé pour mimer, chez la souris, les agressions hépatiques chroniques (Yanguas *et al.*, 2016). Il s'agit d'autre part du cisplatine (Cisplatine), dont l'utilisation est associée à l'apparition fréquente d'effets indésirables de type néphrotoxique (Miller *et al.*, 2010).

## II. Exemple du tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>)

### 1. Généralités

Le tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>) est composé d'un atome de carbone central et de quatre atomes de chlore (**Figure 3**). Il a été utilisé pendant de nombreuses années dans la composition d'agents nettoyants, de solvants ou d'insecticides, et comme précurseur de fluides frigorigènes dont le chlorofluorocarbure (*Toxicological profile for carbon tetrachloride*, 2005). Le tétrachlorométhane est un liquide incolore, très peu soluble dans l'eau (0,8 g/L à 25 °C) mais miscible dans de nombreux solvants organiques. Le CCl<sub>4</sub> est un composé très volatil d'odeur caractéristique éthérée ([Tétrachlorométhane \(FT 8\). Caractéristiques - Fiche toxicologique - INRS](#)).

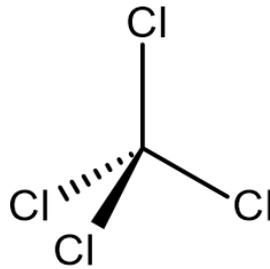
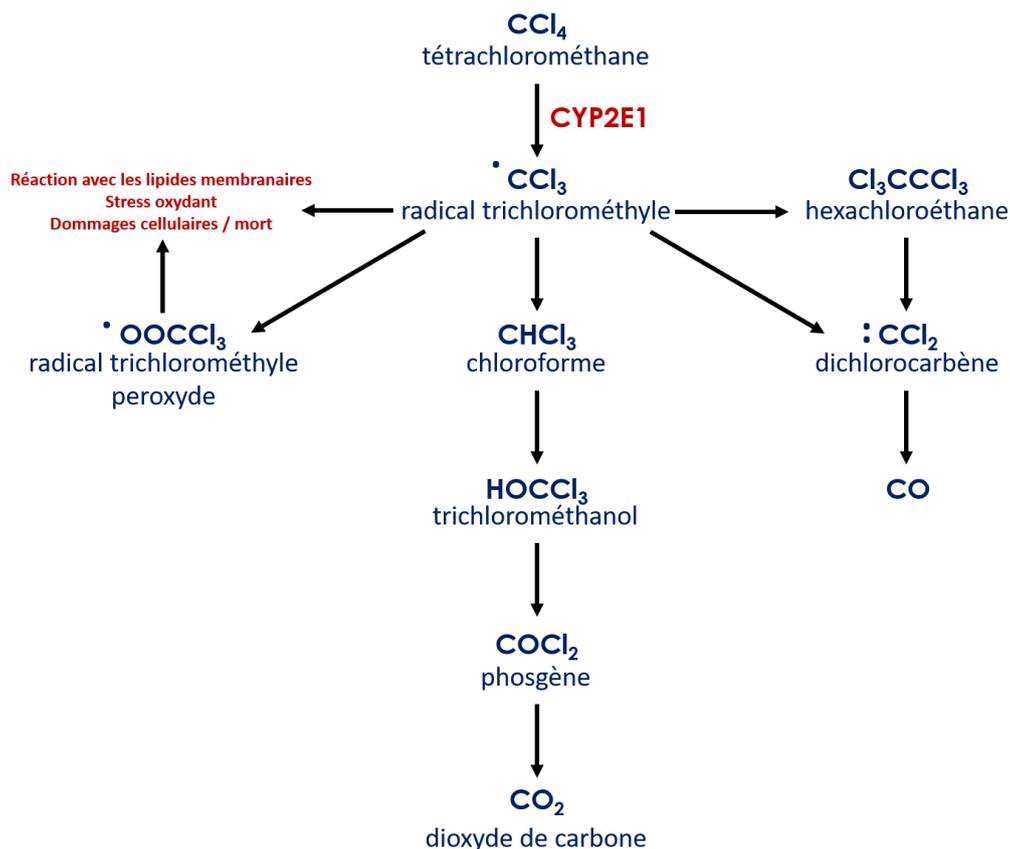


Figure 3 : Structure chimique du CCl<sub>4</sub>.

## 2. Toxicocinétique et métabolisme du CCl<sub>4</sub>

Les données toxicocinétiques du CCl<sub>4</sub> restent limitées chez l'Homme et s'appuient surtout sur des études réalisées chez les rongeurs. Le CCl<sub>4</sub> présente une toxicité importante (Thrall, 2000) lorsqu'il est inhalé, ingéré ou absorbé par voie cutanée (Weber, Boll and Stampfl, 2003). Ses sites d'absorption privilégiés sont pulmonaire (60 %) et gastro-intestinal (Chen, Chi and Smuckler, 1977; Koporec *et al.*, 1995; Weber, Boll and Stampfl, 2003). Une fois dans l'organisme, le CCl<sub>4</sub> est distribué dans tout l'organisme, majoritairement au niveau du foie, des reins, du cerveau, des muscles, des graisses et dans le sang (Srinivasan *et al.*, 2005; Makni *et al.*, 2012). Bien que les données concernant le caractère carcinogène du CCl<sub>4</sub> soient limitées chez l'Homme, il a été démontré que le CCl<sub>4</sub> pouvait induire un hépatocarcinome chez les rongeurs (Frezza *et al.*, 1994).

Le tétrachlorométhane est essentiellement métabolisé dans le foie, mais aussi au niveau des reins, des poumons et dans d'autres tissus exprimant des CYP (Sanzgiri *et al.*, 1995). Le CYP2E1 est le principal cytochrome P450 permettant la conversion du CCl<sub>4</sub> en radical trichlorométhyle (Ghallab and Hengstler, 2018). En fonction de la concentration en oxygène, le radical trichlorométhyle peut alors être converti en hexachloroéthane, chloroforme ou radicaux trichlorométhylpéroxyde et dichlorométhylcarbène. Les métabolites finaux du CCl<sub>4</sub> sont le phosgène, le monoxyde de carbone et le dioxyde de carbone (U.S. EPA. IRIS Toxicological Review of Carbon Tetrachloride) (**Figure 4**).



**Figure 4 : Métabolisme du  $\text{CCl}_4$ .** La métabolisme du  $\text{CCl}_4$  par le CYP2E1 entraîne la formation d'un radical trichlorométhyle ( $\text{CCl}_3$ ). En fonction de la concentration en oxygène, le radical trichlorométhyle peut être converti en radical trichlorométhyle peroxyde, en chloroforme ou en hexachloroéthane. Les métabolites finaux du  $\text{CCl}_4$  sont le monoxyde de carbone, le phosgène et le dioxyde de carbone. Le radical trichlorométhyle réagit avec certaines molécules, en particulier les lipides membranaires, induisant un stress oxydant ou des dommages cellulaires.

### 3. Hépatotoxicité

#### a. Peroxydation lipidique

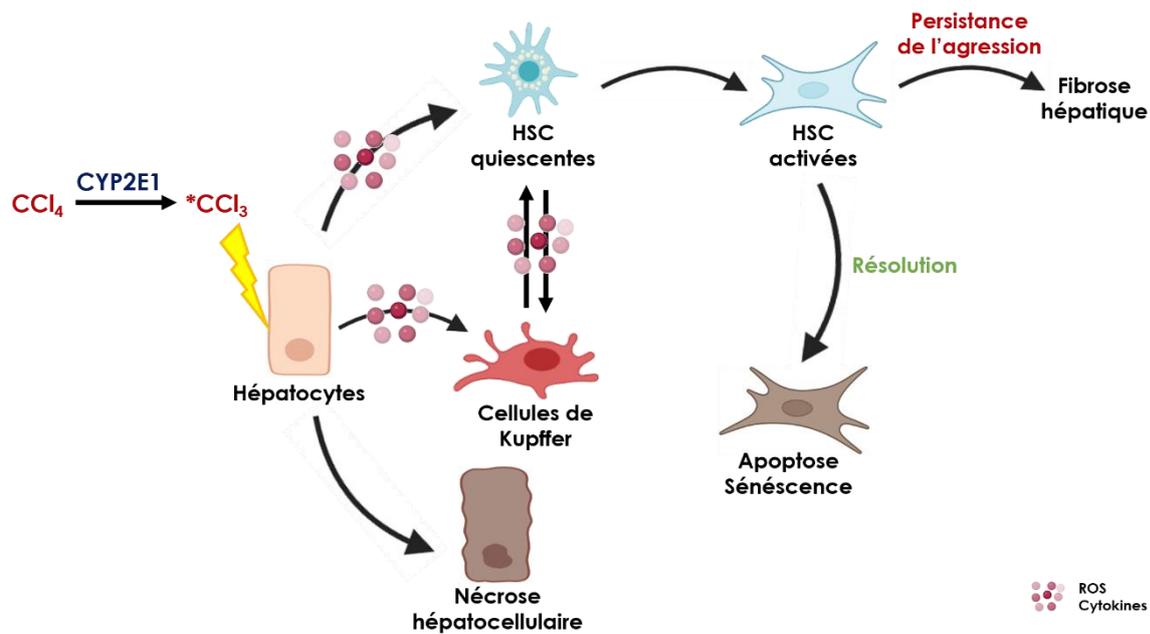
La toxicité hépatique du  $\text{CCl}_4$  s'explique principalement par sa bio-activation par le CYP2E1 au niveau des zones centro-lobulaires. Les métabolites primaires formés (radicaux libres trichlorométhyle et trichlorométhylperoxyde) sont très réactifs et se lient de manière covalente préférentiellement aux lipides membranaires, entraînant un mécanisme de peroxydation lipidique (Gillette, Mitchell and Brodie, 1974; de Groot and Noll, 1986). Ce processus induit ainsi la lyse cellulaire et la libération de composés cytoplasmiques. De plus, certains métabolites peuvent former des adduits aux protéines et à l'ADN.

Au total, la peroxydation lipidique entraîne des effets biologiques délétères, notamment une perturbation de la signalisation cellulaire, des dommages à l'ADN et des effets cytotoxiques

(Makni *et al.*, 2012; Alm-Eldeen *et al.*, 2016) en produisant du malondialdéhyde, du propanal, de l'hexanal et du 4-hydroxynonanal, composé le plus toxique (Manibusan, Odin and Eastmond, 2007; Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014; Kim *et al.*, 2015). De plus, le CCl<sub>4</sub> perturbe l'homéostasie calcique des hépatocytes, entraînant l'altération du cytosquelette et l'activation d'enzymes comme des protéases, endonucléases et phospholipases conduisant à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Nicotera, Bellomo and Orrenius, 1992; Jaeschke *et al.*, 2002). Le mécanisme de peroxydation lipidique peut être atténué par des agents antioxydants tels que le glutathion ou encore la N-acétylcystéine. Cependant, lorsque ces systèmes sont dépassés (épuisement des réserves de glutathion par exemple), le processus s'amplifie et conduit à terme, à la modification de l'architecture hépatique et l'altération des fonctions hépatiques (Xu *et al.*, 2019; Unsal, Cicek and Sabancilar, 2021).

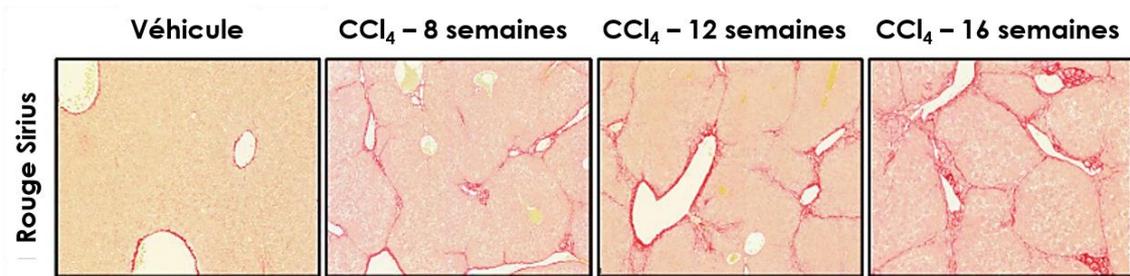
#### **b. Fibrose hépatique**

Au niveau moléculaire, les hépatocytes subissant l'agression répétée du CCl<sub>4</sub> relarguent des cytokines pro-inflammatoires et des espèces réactives à l'oxygène (ROS), entraînant l'activation des cellules de Kupffer (macrophages résidents), des cellules stellaires hépatiques (HSC) et des hépatocytes environnants (Koyama and Brenner, 2017; Yoshizawa *et al.*, 2022). Les cellules de Kupffer activées sécrètent en réponse de l'oxyde d'azote et des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6 et IL-10 (Koyama and Brenner, 2017; Popović *et al.*, 2019). Ainsi, le TGF- $\beta$  sécrété par les macrophages entraîne l'activation des HSC qui perdent leur contenu en acide rétinoïque et se différencient en myofibroblastes. Les HSC activés expriment alors l'actine alpha du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA) et synthétisent de manière accrue du collagène de type I, deux caractéristiques du processus de fibrogenèse (Hellerbrand *et al.*, 1999; Nieto *et al.*, 2001) (**Figure 5**).



**Figure 5 : Toxicité hépatique induite par le CCl<sub>4</sub>.** Le métabolisme du CCl<sub>4</sub> par le CYP2E1 dans les hépatocytes entraîne la formation d'un radical trichlorométhyle capable de se lier de manière covalente aux lipides membranaires et entraînant le mécanisme de peroxydation lipidique. Ainsi, les hépatocytes lésés relarguent des ROS et des cytokines pro-inflammatoires entraînant l'activation des cellules de Kupffer et des HSC. La persistance de l'agression induit ainsi une fibrose hépatique. En cas de résolution, les HSC activées entre en apoptose ou deviennent sénescence. HSC = cellules stellaires hépatiques ; ROS = espèces réactives à l'oxygène.

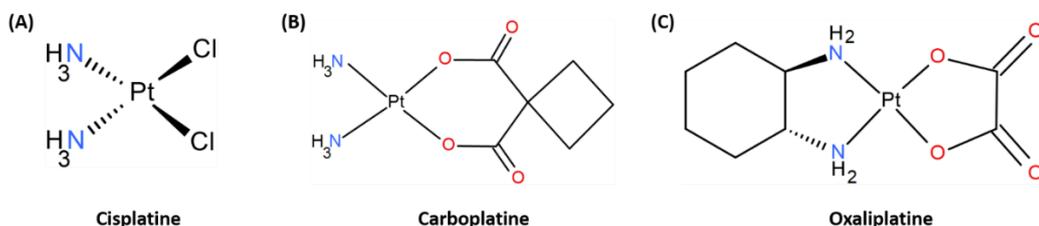
Le caractère fibrogénique de l'administration chronique de CCl<sub>4</sub> a été montré par Cameron et Karunaratne en 1936 chez le rat (Cameron and Karunaratne, 1936). Depuis, l'administration de CCl<sub>4</sub> constitue un modèle de choix, couramment utilisé en recherche pré-clinique, pour induire une fibrose hépatique, une cirrhose voire un hépatocarcinome (Frezza *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2016; Hollenbach, 2017). Bien que d'autres modèles de fibrose hépatique aient été mis en place pour mimer les différentes étiologies, l'administration de CCl<sub>4</sub> reste le modèle le plus utilisé (Yanguas *et al.*, 2016). De manière générale, les modèles consistent à administrer le CCl<sub>4</sub> par injections intra-péritonéales 2 à 3 fois par semaine pendant 4 à 6 semaines, à des doses comprises entre 300 et 1000 µL/kg (Constandinou, Henderson and Iredale, 2005) (Figure 6).



**Figure 6 : L'administration chronique de CCl<sub>4</sub> induit des lésions de fibrose.** Des souris Balb/C ont reçu des injections intra-péritonéales de CCl<sub>4</sub>, 2 fois par semaine jusqu'à 16 semaines. Les lésions de fibrose sont caractérisées par des dépôts de collagène, colorés au rouge sirius. D'après <https://www.biomodels.com/disease-areas/fibrosis/liver-fibrosis> (consulté le 03/02/2023).

### III. Exemple du cisplatine (CisPt)

Le cisplatine (CisPt) (pour cis-diaminodichloroplatine (II)) (**Figure 7.A**) est un agent anti-cancéreux de la classe des alkylants. Il a été synthétisé pour la première fois en 1845 (Peyrone, 1845), mais ce n'est qu'en 1965 que ses propriétés anti-prolifératives sur *E.coli* ont été mises en évidence par le Dr Rosenberg (Rosenberg, Vancamp and Krigas, 1965; Dasari and Tchounwou, 2014; Cocetta, Ragazzi and Montopoli, 2019). Le Cisplatine a obtenu par la suite une autorisation de mise sur le marché par la FDA (Food and Drug Administration) en 1978 pour ses propriétés antitumorales (Cocetta, Ragazzi and Montopoli, 2019). Il est encore à l'heure actuelle l'un des agents anti-cancéreux les plus utilisés. Environ 50% des patients atteints d'un cancer sont traités par une chimiothérapie à base de cisplatine, notamment pour des cancers solides (cancer des testicules, des ovaires, de la vessie, des poumons, ...) (Dasari and Tchounwou, 2014; Ghosh, 2019).



**Figure 7 : Structure des principaux sels de platine.** (A) cisplatine ; (B) carboplatine ; (C) Oxaliplatine.

Cependant, le cisplatine induit des effets indésirables sévères : néphrotoxicité, neurotoxicité, ototoxicité et hépatotoxicité (Oun, Moussa and Wheate, 2018). De plus, de nombreuses tumeurs présentent une résistance au Cisplatine (Köberle *et al.*, 2010). Une dizaine d'autres

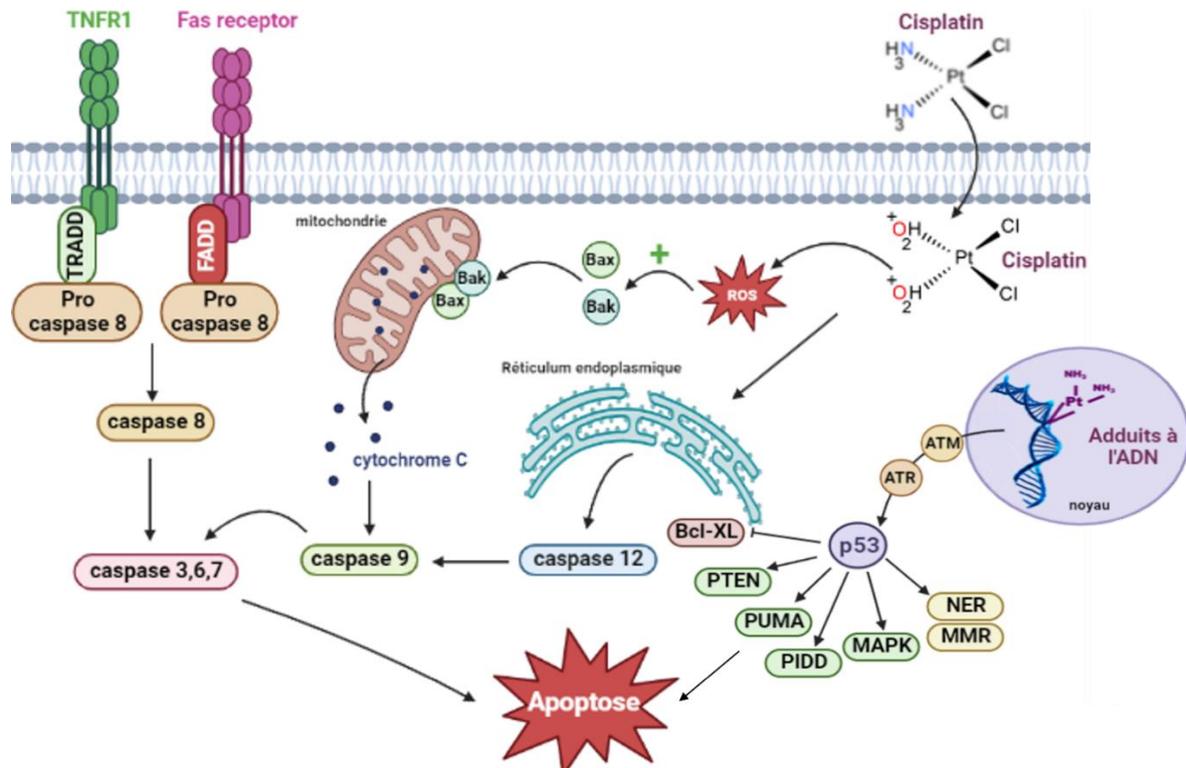
dérivés du platine a donc été développée afin d'améliorer les propriétés anti-cancéreuses des sels de platine. A ce jour, seuls le carboplatine et l'oxaliplatine ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (Shah and Dizon, 2009) (**Figure 7.B -C**).

### 1. Prise en charge cellulaire du cisplatine

Le cisplatine, administré par voie intraveineuse, reste inerte dans la circulation sanguine, la concentration en ions chlorure étant importante [105 mM] (Petrovic and Todorovic, 2016; Makovec, 2019). Le Cisplatine pénètre dans la cellule principalement par diffusion passive ou grâce à des transporteurs de cuivre tels que CTR1 (SLC31A1) et CTR2 (SLC31A2) (Copper Transporter Receptors 1 et 2) (Eljack *et al.*, 2014). La faible concentration intracellulaire en ions chlorure [4 mM] favorise la substitution des atomes de chlore du cisplatine par des molécules d'eau *via* des réactions de mono- et di-aquations (Kelland, 2000). Ainsi, le Cisplatine activé et chargé positivement sous la forme  $[Pt(NH_3)_2H_2O]^{2+}$  réagit fortement avec les biomolécules cellulaires nucléophiles dont les acides nucléiques, les protéines, les phospholipides membranaires et les molécules contenant des groupements thiols (Dasari and Tchounwou, 2014). En particulier, la formation du conjugué platine-glutathion, catalysée par la glutathion-S-transférase (GST), enzyme de phase II, est une étape importante de l'inactivation et de l'élimination du cisplatine (Sadzuka, Shimizu and Takino, 1994). Le cisplatine est également inactivé en se liant aux métallothionéines (Kelley *et al.*, 1988). De plus, des études cliniques et *in vitro* montrent que certains mécanismes de résistance des cellules tumorales au cisplatine sont liés à l'expression de la glutathion-S-transférase (Hrubisko, McGown and Fox, 1993; Chen, Wang and Gou, 2019) et des métallothionéines (Hrubisko, McGown and Fox, 1993; Si and Lang, 2018). Les protéines de transport du cuivre (ATP7A et ATP7B) (Samimi *et al.*, 2004) et du platine (SLC22A2 et SLC47A1) (Motohashi and Inui, 2013), ainsi que les transporteurs de type ABC participent également à l'efflux cellulaire du cisplatine (Suzuki, Nishio and Tanabe, 2001). Les cytochromes P450 (CYP), quant à eux, n'interviennent pas dans la biotransformation du cisplatine. En revanche, ils sont associés à une toxicité accrue du cisplatine notamment au niveau hépatique et rénal (Quintanilha *et al.*, 2017). En effet, plusieurs études ont montré *in vitro* et *in vivo* que le Cisplatine induit l'expression du CYP2E1 et conduit à la production accrue de ROS, participant aux effets toxiques (Liu and Baliga, 2003) et hépatique (Lu and Cederbaum, 2006).

## 2. Mode d'action du cisplatine

L'ensemble des mécanismes d'action du Cisplatine est présenté **Figure 8**. On distingue ainsi quatre voies principales impliquées dans le mécanisme d'action du Cisplatine : la voie génotoxique, la voie mitochondriale, la voie du réticulum endoplasmique et la voie des récepteurs de mort cellulaire.



**Figure 8 : Mécanismes d'action du cisplatine.** Lors de son entrée dans la cellule, le cisplatine active diverses voies de signalisation à l'origine de son activité anti-néoplasique. TNFR1 : Tumor Necrosis Factor 1 ; TRADD : TNFR-Associated Death Domain; FADD : Fas-Associated Death Domain ; Bak : Bcl-2-homologous Antagonist/Killer ; Bax : Bcl2-Associated X protein ; ROS : Reactive Oxygen Species ; Bcl-XL : B-Cell Lymphoma-eXtra-Large ; PTEN : Phosphatase and TENSin homolog ; PUMA : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis; PIDD : P53-Induced Death Domain protein 1 ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; NER : Nucleotide Excision Repair ; MMR Mismatch Repair ; ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein ; ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated protein.

### a. Voie génotoxique

Le Cisplatine se lie de manière covalente à l'azote 7 des bases puriques de l'ADN, formant des adduits intra-brins. Lorsqu'elles atteignent un certain seuil, ces lésions entraînent les processus soit de sénescence, soit de mort cellulaire par apoptose (Nyberg *et al.*, 2002; Wagner and Karnitz, 2009). Par contre, lorsque les lésions de l'ADN sont limitées, les adduits entraînent des distorsions de la double hélice d'ADN, induisant un arrêt du cycle cellulaire en

phase G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub> permettant ainsi le processus de réparation de l'ADN (Wagner and Karnitz, 2009) grâce à l'activation des systèmes MMR (Mismatch Repair, réparation des mésappariements) et NER (Nucleotide Excision Repair, excision des nucléotides) (Moggs *et al.*, 1997). La formation de dommages à l'ADN induit l'activation de la protéine suppresseur de tumeur p53, conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Ghosh, 2019) (**Figure 8**).

## **b. Mort cellulaire**

Les voies de mort cellulaire impliquent deux voies principales : la voie extrinsèque des récepteurs de mort et la voie intrinsèque mitochondriale (Rebillard, Lagadic-Gossman and Dimanche-Boitrel, 2008).

### *i. La voie des récepteurs de mort*

Le Cisplatine active la voie des récepteurs de mort dont font partie les récepteur Fas et TNFR1 (Récepteur 1 au TNF $\alpha$ ). L'activation de ces récepteurs par leur ligand respectif FasL et TNF $\alpha$  entraîne l'activation de la caspase 8. Cette dernière active la voie des caspases 3, 6 et 7, et par conséquent le processus apoptotique (Fuertes *et al.*, 2002; Kroemer, Galluzzi and Brenner, 2007; Ghosh, 2019) (**Figure 8**).

### *ii. La voie mitochondriale*

La production importante de ROS induite par le Cisplatine conduit à la translocation des protéines pro-apoptiques Bax (Bcl2-associated X protein) et Bak (Bcl2-homologous antagonist killer) à la membrane mitochondriale externe ainsi que leur activation (Kroemer, Galluzzi and Brenner, 2007). Ce processus conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et permet la libération de molécules pro-apoptiques dans le cytoplasme comme le cytochrome C, à l'origine de la formation du complexe apoptosome et de l'activation de la caspase 9 (Fuertes *et al.*, no date), qui, à son tour, active les caspases effectrices 3, 6 et 7 conduisant à la mort cellulaire. En parallèle, les protéines Bax et Bak séquestrent Bcl-2 et Bcl<sub>-XL</sub> (B-Cell Lymphoma-eXtra-Large), deux protéines cyto-protectrices (Fulda, Galluzzi and Kroemer, 2010) (**Figure 8**).

### *iii. La voie du réticulum endoplasmique*

Le Cisplatine induit également un stress au niveau du réticulum endoplasmique, entraînant l'activation en cascade des caspases 12 et 9 puis des caspases effectrices 3, 6 et 7 conduisant au processus apoptotique (Mandic *et al.*, 2003; Xu, Wang and LI, 2014) (**Figure 8**).

### **3. Effets indésirables**

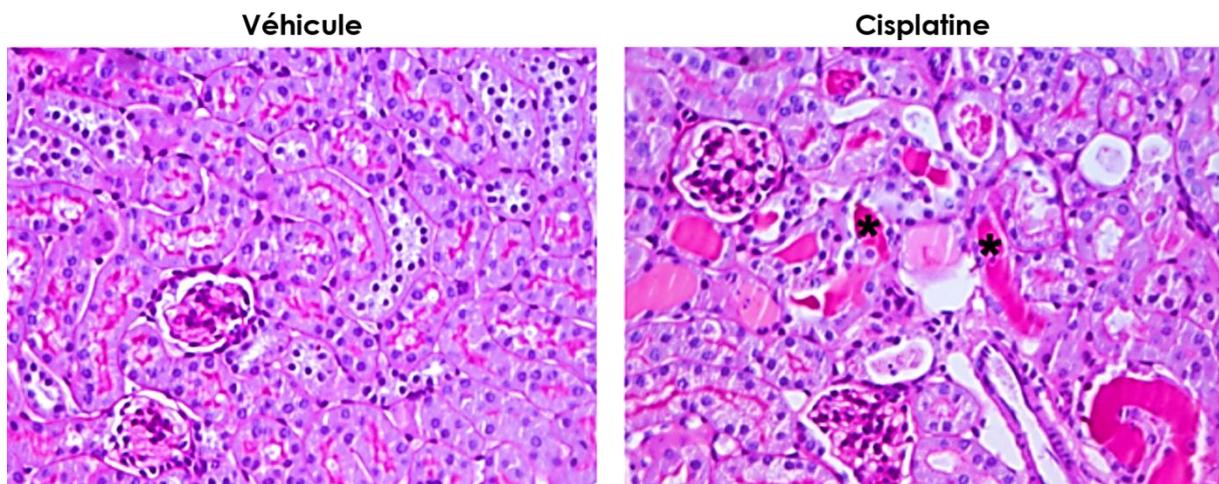
Par ses mécanismes d'action et plus particulièrement par la production de ROS, le Cisplatine est à l'origine de divers effets indésirables comme la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité, l'ototoxicité ou encore la neurotoxicité. Bien que le Cisplatine soit un agent anti-cancéreux efficace et largement prescrit, l'apparition de ces effets indésirables nécessite d'adapter la posologie voire d'arrêter le traitement pouvant entraîner un effet péjoratif chez les patients (Minchinton and Tannock, 2006).

#### **a. Néphrotoxicité**

La néphrotoxicité du Cisplatine affecte 20 à 40% des patients traités sous chimiothérapie à base de Cisplatine (Miller *et al.*, 2010). Elle est cumulative et survient préférentiellement chez les patients déshydratés ou chez les patients déjà traités avec d'autres molécules néphrotoxiques (anti-inflammatoires non stéroïdiens par exemple) (Higuchi and Yanagawa, 2019).

Le Cisplatine est éliminé au niveau rénal, à la fois par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire (Yao *et al.*, 2007). Le Cisplatine s'accumule au niveau des cellules tubulaires proximales (CTP) dans lesquelles les concentrations de Cisplatine peuvent être cinq fois plus élevées que dans le sérum (Kuhlmann, Burkhardt and Köhler, 1997). Une partie du Cisplatine pénètre dans les CTP grâce au transporteur OCT2 (Organic Cation Transporter 2, SLC22A2), l'autre partie est métabolisée par les enzymes GGT (Gamma Glutamyl Transpeptidase), APN (Amino-Peptidase N) et CCBL (Cysteine S conjugate Beta Lyase) en composés thiols hautement réactifs (Hanigan and Devarajan, 2003; Townsend *et al.*, 2009). Le Cisplatine induit ainsi un dysfonctionnement des mitochondries et du réticulum endoplasmique entraînant la mort cellulaire des CTP par apoptose (Pabla and Dong, 2008). Le Cisplatine réagit avec les groupements thiols des protéines membranaires des cellules rénales tubulaires proximales

conduisant ainsi à des altérations de la bordure en brosse des cellules épithéliales tubulaires, des lésions du système vasculaire rénal et une nécrose du parenchyme rénal (Peres and da Cunha, 2013). Au niveau histologique, on observe une nécrose tubulaire (Rock and Kono, 2008; Holditch *et al.*, 2019) mais également une fibrose interstitielle induite par l'administration chronique de Cisplatine (Shi *et al.*, 2018; Budu *et al.*, 2021; Sears and Siskind, 2021) (**Figure 9**).



**Figure 9 : L'administration chronique de cisplatine des lésions au niveau rénales.** Coloration histologique au PAS (Periodic Acid-Schiff) de reins de souris ayant reçu une administration chronique de cisplatine ou du véhicule. \* représente des tubules proximaux atrophiés. D'après Dewaeles *et al.*, 2022.

Malgré la mise en place de mesures de prévention des effets néphrotoxiques notamment l'hyperhydratation à base de chlorure de sodium (NaCl) (Cornelison and Reed, 1993), la néphrotoxicité reste une problématique majeure de l'utilisation du Cisplatine (Miller *et al.*, 2010). En effet, les patients développent une insuffisance rénale aigüe (Hamroun *et al.*, 2019), caractérisée par une diminution de leur fonction rénale (Latcha *et al.*, 2016).

### **b. Neurotoxicité**

La neurotoxicité du Cisplatine se traduit principalement par une neuropathie périphérique (ou neuropathie sensorielle). Elle touche 30 à 40% des patients traités et se caractérise par une atteinte au niveau des mains et des pieds pouvant s'étendre aux coudes et genoux (Podratz *et al.*, 2011; Staff *et al.*, 2017). Elle se traduit par une perte de la proprioception, des

engourdissements, des picotements, des fourmillements, une douleur, une diminution de la sensibilité des doigts et des orteils, ainsi qu'une diminution des réflexes achilléens (Argyriou *et al.*, 2012; Staff *et al.*, 2017). Ces symptômes persistent plusieurs mois après l'arrêt du traitement et diminuent progressivement avec le temps (Siegal and Haim, 1990).

Au niveau moléculaire, la neurotoxicité atteint principalement le système nerveux périphérique et plus particulièrement les ganglions de la racine dorsale (DRG). En effet, les DRG ne sont pas protégés par la barrière hémato-encéphalique (BHE) et sont vascularisés par des capillaires fenestrés, ce qui les rend particulièrement vulnérables aux substances exogènes tels que le Cisplatine (Carozzi, Canta and Chiorazzi, 2015). Le Cisplatine induit des dommages à l'ADN (nucléaire et mitochondrial) entraînant une production de ROS importante au niveau des DRG, riches en mitochondries (Ciarimboli, 2012; Carozzi, Canta and Chiorazzi, 2015).

Bien que des solutions thérapeutiques soient proposées pour réduire la neurotoxicité comme l'administration de N-acétylcystéine (Cascinu *et al.*, 2002), de lidocaïne (van den Heuvel *et al.*, 2017), ou des infusions de calcium et de magnésium (Knijn *et al.*, 2011), aucun traitement préventif n'a, à ce jour, démontré une véritable efficacité (Hu *et al.*, 2019).

### **c. Ototoxicité**

L'ototoxicité induite par le Cisplatine survient chez 10 à 90% des patients, avec une sévérité variable (Yancey *et al.*, 2012; Petrovic and Todorovic, 2016; Tang *et al.*, 2021). La toxicité auditive se caractérise par une perte d'audition qui apparaît progressivement au cours des cycles de chimiothérapie (Tang *et al.*, 2021). L'ototoxicité est plus sévère chez les enfants car elle entraîne des conséquences sur leur développement du langage, leur éducation et leur sociabilisation (Knight, Kraemer and Neuwelt, 2005). Au niveau cellulaire, le Cisplatine pénètre dans les cellules ciliées de l'oreille interne grâce au transporteur de cuivre CTR1 (SLC31A1) et au transporteur de cations organiques OCT2 (Organic Cation Transporter 2) (SLC22A2) entraînant la production de ROS, une réponse inflammatoire et la mort cellulaire par apoptose (Vanruijven, Degroot and Smoorenburg, 2004; Rybak *et al.*, 2007). Afin de limiter les effets ototoxiques, l'administration locale ou systémique d'anti-oxydants et d'anti-inflammatoires est envisagée (Rybak *et al.*, 2007; Ghosh, 2019).

#### **d. Hépatotoxicité**

Le Cisplatine induit des effets hépatotoxiques chez 30 à 40% des patients (Abd Rashid *et al.*, 2021). Bien qu'il ne soit pas métabolisé par des réactions de phase I, le Cisplatine induit l'expression du CYP2E1, à l'origine de la formation accrue de radicaux libres de type anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et hydroxyl ( $\cdot OH$ ) et de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Quintanilha *et al.*, 2017). Ces ROS ainsi produites entraînent des lésions tissulaires et peuvent conduire à terme à une insuffisance hépatique (Wu and Zern, 2000; Kurutas, 2016). Au niveau histologique, on observe une dilatation des sinusoides, une dégénération hépatocellulaire et une prolifération des cellules de Kupffer (Hassan *et al.*, 2022).

#### **e. Toxicité gastro-intestinale**

Suite à l'administration de Cisplatine et en dépit de la co-administration d'antiémétiques, 70 à 80% des patients développent des nausées et des vomissements pendant environ 24h, voire plus (Bearcroft *et al.*, 1999; Tsang, Al-Fayea and Au, 2009). Les patients peuvent également présenter d'autres symptômes, tels que des diarrhées (Tsang, Al-Fayea and Au, 2009), une perte de goût ou encore l'apparition d'un goût métallique (Choi *et al.*, 2002). Ces effets indésirables sont d'autant plus importants que le Cisplatine est combiné avec d'autres agents néoplasiques (Tsang, Al-Fayea and Au, 2009).

**Chapitre 1 :**  
**Rôle et potentiel thérapeutique de l'ARN non  
codant DNM3OS dans la fibrose hépatique**

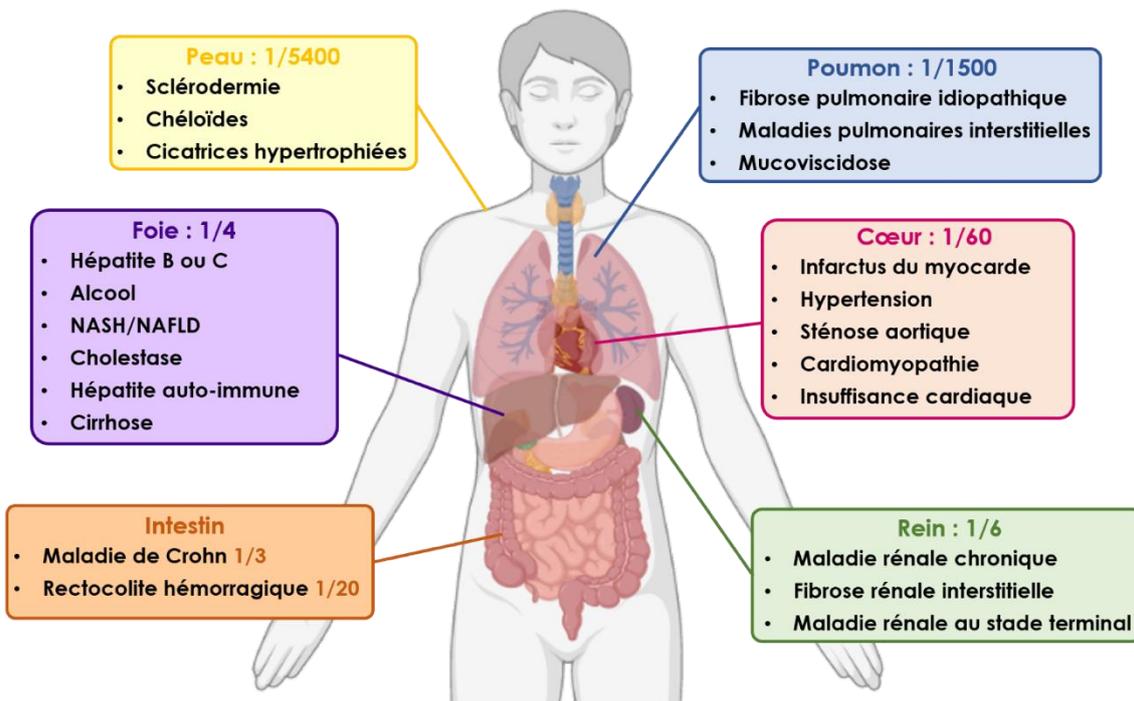
---

# A. Introduction

## I. Généralités sur la fibrose tissulaire

La fibrose tissulaire est une conséquence pathologique commune à la plupart des maladies inflammatoires chroniques, mais peut également résulter d'une agression iatrogénique ou d'un défaut génétique (Wynn, 2011). La fibrose est un processus progressif et dynamique faisant donc généralement suite à une agression chronique. Elle est souvent associée à un processus de cicatrisation incontrôlée aboutissant au dépôt excessif et persistant de tissu conjonctif cicatriciel (Thannickal *et al.*, 2014).

La fibrose tissulaire peut affecter différents types d'organe (peau, poumons, cœur, reins, intestins, foie) et pourrait affecter 1 personne sur 4 dans le monde (Wynn and Ramalingam, 2012; Latella and Rieder, 2017; Zhao *et al.*, 2020) (**Figure 10**). De nombreux facteurs peuvent contribuer au développement du processus de fibrose : des anomalies génétiques, des infections chroniques, une exposition prolongée à des toxines, des xénobiotiques, des fumées (de cigarette ou autre), une maladie auto-immune... (Wynn and Ramalingam, 2012). Ces agressions chroniques entraînent l'activation des fibroblastes en myofibroblastes et l'accumulation de dépôts de collagène, conduisant à une modification de l'architecture tissulaire (Bataller and Brenner, 2005; Wynn and Ramalingam, 2012). La fibrose conduit généralement à terme à une perte de fonction de l'organe voire au décès du patient. En effet, la fibrose est une cause majeure de morbi-mortalité, responsable de 45% de décès dans les pays industrialisés (Wynn, 2007). Bien que les mécanismes de fibrose soient similaires, indépendamment de l'organe atteint, les options thérapeutiques restent limitées à l'heure actuelle (Thannickal *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2020).

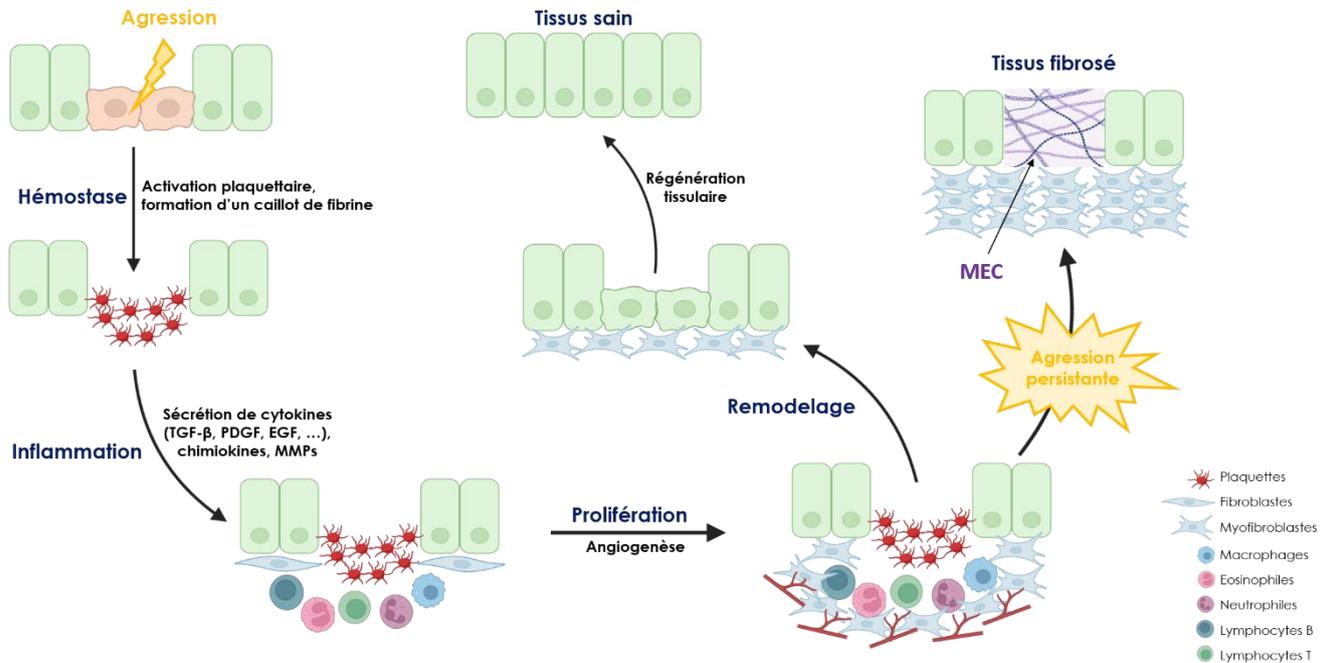


**Figure 10 : Prévalence et causes des principaux types de fibrose tissulaire.** La fibrose tissulaire affecte différents organes avec des prévalences variables. C'est une conséquence pathologique à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques. La fibrose cutanée touche 1 personne sur 5400 et est associée à la sclérodermie, les chéloïdes ou encore les cicatrices hypertrophiées. La fibrose pulmonaire touche environ 1 personne sur 1500 et est associée à la fibrose pulmonaire idiopathique, les maladies pulmonaires interstitielles et la mucoviscidose. La fibrose cardiaque touche 1 personne sur 60 ayant présenté un infarctus du myocarde, de l'hypertension, une sténose aortique, une cardiomyopathie ou encore une insuffisance cardiaque. La fibrose rénale touche 1 personne sur 6 présentant une maladie rénale chronique, une fibrose rénale interstitielle ou une maladie rénale au stade terminal. La fibrose intestinale apparaît chez 1/3 des patients ayant une maladie de Crohn et chez 1 personne sur 20 présentant une rectocolite hémorragique. La fibrose hépatique est la plus fréquente et touche une personne sur 4 ayant une hépatite B, une consommation excessive d'alcool, une NASH, une cholestase, une hépatite auto-immune ou une cirrhose. NASH = Non Alcoholic SteatoHepatitis ; NAFLD = Non Alcoholic Fatty Liver Disease.

## 1. Mécanisme général de la fibrose tissulaire

La fibrose fait suite à une agression tissulaire chronique et se caractérise par une accumulation de tissus conjonctifs, notamment des composants de la matrice extracellulaire (MEC), tels que le collagène ou la fibronectine dans, et autour des organes lésés (Wynn, 2011). Quel que soit l'organe touché et indépendamment de la cause initiale, les mécanismes mis en jeu sont similaires et correspondent à un processus de réparation tissulaire infructueux. En effet, de manière physiologique, une agression tissulaire entraîne un processus biologique complexe permettant le remplacement des cellules lésées afin de restaurer la fonction normale des tissus (Wynn, 2007 ; Wynn, 2008). En cas d'agression chronique, les mécanismes de cicatrisation deviennent excessifs et entraînent le remplacement du tissu sain par du tissu cicatriciel et donc à terme à la perte de fonction de l'organe (Wynn, 2007). Le processus de

fibrose est multifactoriel et fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires, dont des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Il se décompose en plusieurs phases : une phase d'hémostase, une phase inflammatoire, une phase proliférative et une phase de remodelage (Wynn and Ramalingam, 2012; Pottier *et al.*, 2014; Wilkinson and Hardman, 2020) (Figure 11).



**Figure 11 : Mécanisme de fibrose tissulaire.** Une agression tissulaire au niveau de cellules épithéliales (ou endothéliales) entraîne l'activation des plaquettes qui s'agrègent au site lésé. Des facteurs de coagulation plasmatiques sont activés et un caillot de fibrine ainsi qu'une MEC provisoire sont formés. Les cellules épithéliales sécrètent alors des métalloprotéinases matricielles (MMP) pour permettre le recrutement de cellules inflammatoires : Lymphocytes B et T, macrophages, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Les cellules inflammatoires produisent des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance pour induire une réponse de cicatrisation caractérisée par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et l'activation des fibroblastes en myofibroblastes. Ces derniers expriment l' $\alpha$ -SMA (actine-alpha du muscle lisse) et sécrètent les composants de la MEC (collagène et fibronectine). Les myofibroblastes peuvent avoir diverses origines et provenir de cellules mésenchymateuses, de fibrocytes, de péricytes, de cellules épithéliales par le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). S'en suit une phase de remodelage où les cellules épithéliales se divisent et migrent vers la MEC provisoire pour régénérer le tissu lésé. Cependant, en cas d'agression chronique, l'agression répétée entraîne une accumulation excessive des composants de la MEC, à l'origine du processus de fibrose.

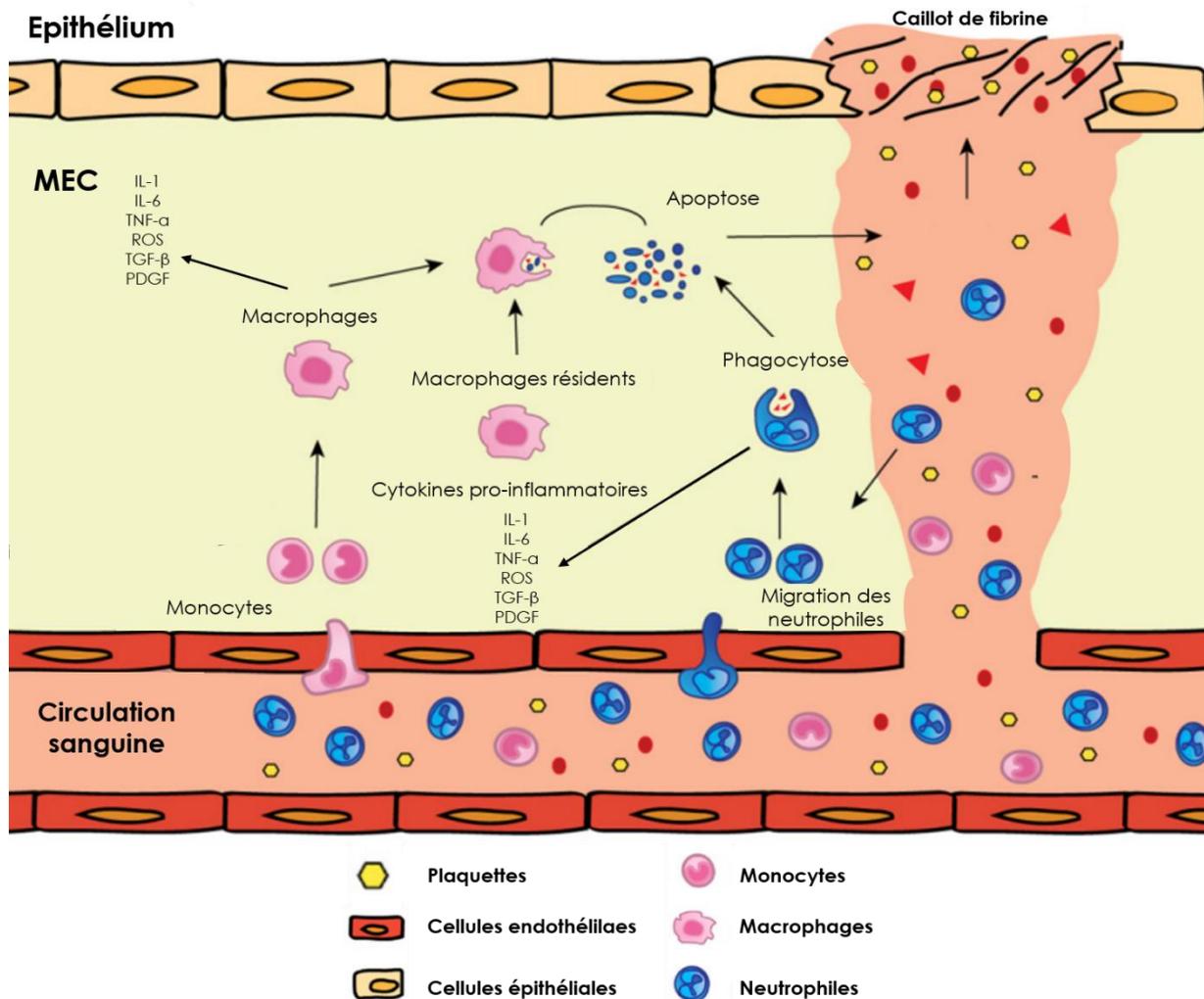
Le processus de cicatrisation est finement régulé. Un dérèglement de chacune de ces phases peut entraîner la mise en place d'un processus incontrôlé qui devient pathologique (Wynn and Ramalingam, 2012).

### **a. Phase d'hémostase**

En réponse à une agression, la phase dite d'hémostase ou de coagulation, est la première étape nécessaire au processus de cicatrisation. L'endothélium endommagé induit l'activation des plaquettes par la thrombine. Les plaquettes déversent alors leur contenu intracellulaire, permettant ainsi la formation d'un caillot de fibrine afin de combler la plaie et d'empêcher le saignement. Les récepteurs plaquettaires interagissent avec les composants de la MEC pour favoriser l'adhésion des plaquettes au site d'agression. Les plaquettes sécrètent également des chimiokines (CCL2, CCL3, CCL5, TGF- $\alpha$ ) et des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF), étape essentielle au recrutement des cellules inflammatoires (Mahdavian Delavary *et al.*, 2011; Golebiewska and Poole, 2015).

### **b. Phase inflammatoire**

La phase inflammatoire, initiée dès l'agression (Boniakowski *et al.*, 2017), permet le recrutement de cellules immunitaires, essentielles au processus de cicatrisation, et favorise le remodelage tissulaire en participant à l'élimination des débris cellulaires (Wynn, 2011). Plus précisément, les cellules nécrosées (plaquettes, cellules épithéliales et cellules endothéliales) sécrètent des DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) qui permettent le recrutement des cellules immunitaires résidentes, notamment les monocytes et les neutrophiles (Martin and Leibovich, 2005; Chen and DiPietro, 2017). Une fois recrutés au site d'agression, les monocytes sont différenciés en macrophages (Rodero *et al.*, 2014). Ainsi les neutrophiles et les macrophages éliminent les débris cellulaires par phagocytose et relarguent des espèces réactives à l'oxygène (ROS), des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) ainsi que des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , VEGF, PDGF) nécessaires à la réparation tissulaire (Wahl *et al.*, 1990; Martin and Leibovich, 2005; Mahdavian Delavary *et al.*, 2011) (**Figure 12**).



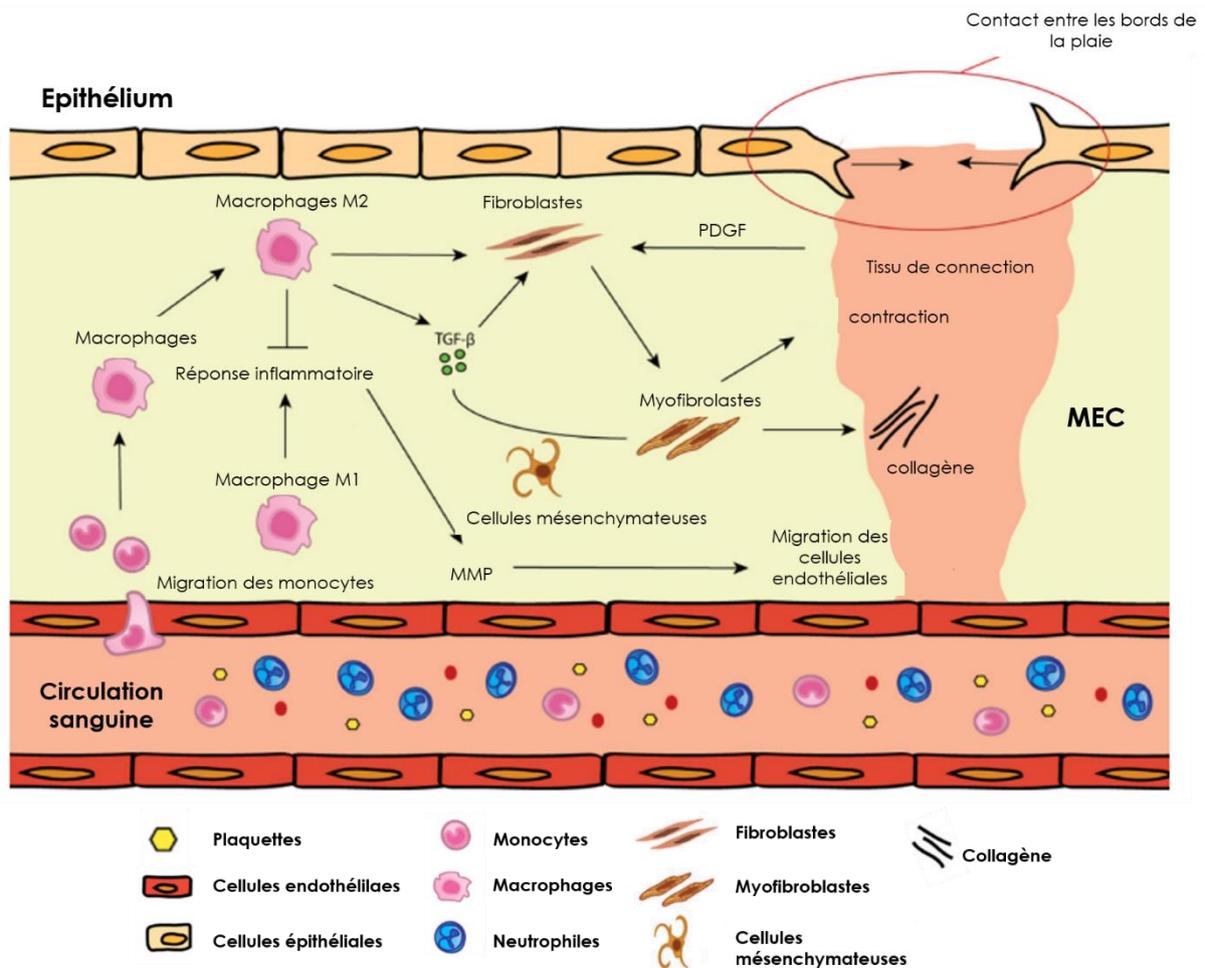
**Figure 12 : La phase inflammatoire.** Les monocytes et les neutrophiles sont recrutés au site d'agression. Les monocytes se différencient ensuite en macrophages. Ainsi, les neutrophiles et les macrophages permettent d'éliminer les débris cellulaires par phagocytose et relarguent des ROS et des cytokines pro-inflammatoires. D'après Mahdavian Delavary *et al.*, 2011. ROS = Espèces Réactives de l'Oxygène.

### c. Phase proliférative

La phase proliférative se caractérise d'une part par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) afin d'apporter les nutriments nécessaires au processus de réparation, d'oxygéner le tissu et d'éliminer les déchets cataboliques (O'Connor *et al.*, 2000; Mahdavian Delavary *et al.*, 2011; Honnegowda *et al.*, 2015; DiPietro, 2016). D'autre part, les fibroblastes sont recrutés au site d'agression et activés en myofibroblastes sous l'effet du TGF- $\beta$  sécrété par les macrophages (Wynn, 2007; Pottier *et al.*, 2014).

La formation de néovaisseaux favorise la migration des fibroblastes activés et des macrophages au site d'agression afin de remplacer le caillot de fibrine par un tissu dit de

« granulation », principalement constitué de fibronectine (Grinnell, Billingham and Burgess, 1981). Au fur et à mesure de l'activation des fibroblastes, le tissu de granulation est progressivement remplacé par du collagène rendant ainsi le tissu plus rigide (Tomasek *et al.*, 2002). Enfin, la ré-épithélialisation est permise grâce aux myofibroblastes permettant une contraction de la plaie afin de recréer un contact entre les bords de la plaie (Wynn, 2007) (Figure 13).



**Figure 13 : La phase de prolifération.** La phase de prolifération comprend deux étapes : l'angiogenèse et la ré-épithélialisation. La formation de nouveaux vaisseaux favorise la migration des fibroblastes et myofibroblastes au site d'agression. Ainsi, les myofibroblastes, grâce à leur propriété contractile, permettent de recréer le contact entre les bords de la plaie. D'après Mahdavian Delavary *et al.*, 2011.

#### d. Phase de remodelage

La phase de remodelage met en jeu des enzymes protéolytiques, en particulier les métalloprotéinases MMP (Matrix Metalloproteinases) et leurs inhibiteurs, les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) (Visse and Nagase, 2003).

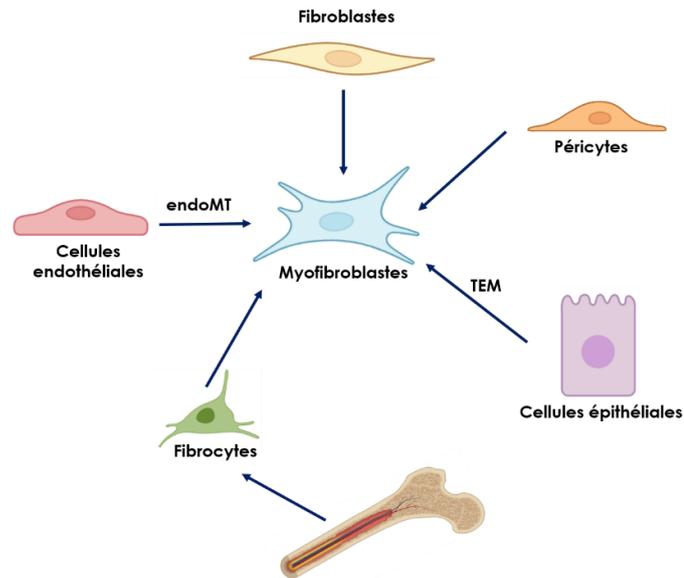
Les myofibroblastes sont majoritairement responsables du remodelage de la MEC. Ils conduisent au remplacement du caillot de fibrine par de la fibronectine, de l'acide hyaluronique, des protéoglycanes et plus tardivement par des fibres de collagène de type III (Darby *et al.*, 2014). Au cours du remodelage, le collagène de type III est remplacé progressivement par du collagène de type I et de l'élastine (Diegelmann and Evans, 2004). Le remodelage se termine par la mort cellulaire par apoptose des macrophages, des cellules endothéliales et des myofibroblastes, entraînant une diminution de l'inflammation et de la synthèse de collagène (Larouche *et al.*, 2018) (**Figure 11**).

## **2. Acteurs cellulaires du processus de fibrogenèse**

Les myofibroblastes ont été décrits pour la première fois en 1867, grâce à la mise en évidence de leurs propriétés contractiles (Cohnheim, 1867). Les myofibroblastes sont des cellules mésenchymateuses partageant les caractéristiques morphologiques des fibroblastes et les capacités contractiles des cellules musculaires lisses (Gabbiani, Ryan and Majne, 1971). Les myofibroblastes ont pour rôle principal de réparer rapidement les tissus lésés notamment au cours du processus de cicatrisation (Pakshir *et al.*, 2020).

### **a. Origine des myofibroblastes**

Dans la plupart des pathologies fibroprolifératives, les myofibroblastes proviennent de différents types cellulaires (Hinz *et al.*, 2007; Mallat and Lotersztajn, 2009; Liu, 2011) (**Figure 14**).



**Figure 14 : Origine des myofibroblastes.** Les myofibroblastes dérivent des fibroblastes, des péricytes, des fibrocytes, des cellules épithéliales par transition épithélio-mésenchymateuse et des cellules endothéliales par transition endothélio-mésenchymateuse. TEM = Transition Epithélio-Mésenchymateuse ; endoMT = Transition endothélio-Mésenchymateuse.

### *i. Les fibroblastes résidents*

Les fibroblastes résidents sont présents naturellement dans les tissus et représentent probablement la source la plus importante de myofibroblastes (Iwaisako *et al.*, 2014). Ces cellules, à l'état de quiescence, permettent de maintenir l'intégrité du tissu grâce à la sécrétion de MEC à un niveau basal (Lynch and Watt, 2018).

### *ii. Les fibrocytes*

Les fibrocytes sont des précurseurs de la moelle osseuse exprimant des marqueurs leucocytaires (CD34 et CD45) et de la vimentine sécrétant du collagène de type I (Baba *et al.*, 2004). Les fibrocytes sont particulièrement importants au cours du processus de fibrose.

### *iii. Les péricytes*

Les péricytes sont des cellules stromales, localisées au niveau de la membrane basale de l'endothélium. Ils ont la capacité de stabiliser l'endothélium et de réguler le flux sanguin (Rockey, 2001).

#### *iv. La transition épithélio-mésenchymateuse*

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus dynamique et complexe, au cours duquel des cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux (Kalluri and Weinberg, 2009). Le processus de TEM se caractérise par (i) la perte de marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine ou encore les protéines de jonctions comme ZO-1 (Zonula Occludens-1) ; (ii) une expression des marqueurs mésenchymateux comme l' $\alpha$ -SMA, la vimentine ou encore la fibronectine. De plus, au cours du processus de TEM, les cellules perdent leur adhérence à la membrane basale et acquièrent des propriétés migratoires et invasives (Burns, Kantharidis and Thomas, 2007).

Le rôle de la TEM dans le processus de fibrose tissulaire est très controversé. En effet, bien que des études aient montré que suite à une agression, les cellules épithéliales acquièrent des marqueurs de cellules mésenchymateuses (Zeisberg and Duffield, 2010; Leopold, Vincent and Wang, 2012), aucune étude *in vivo* chez l'animal, n'a permis d'observer directement la migration de cellules épithéliales à travers la membrane basale. On parlerait dès lors d'une pseudo-TEM (Rock *et al.*, 2011; Rowe *et al.*, 2011; Xu-Dubois *et al.*, 2013).

#### *v. La transition endothélio-mésenchymateuse*

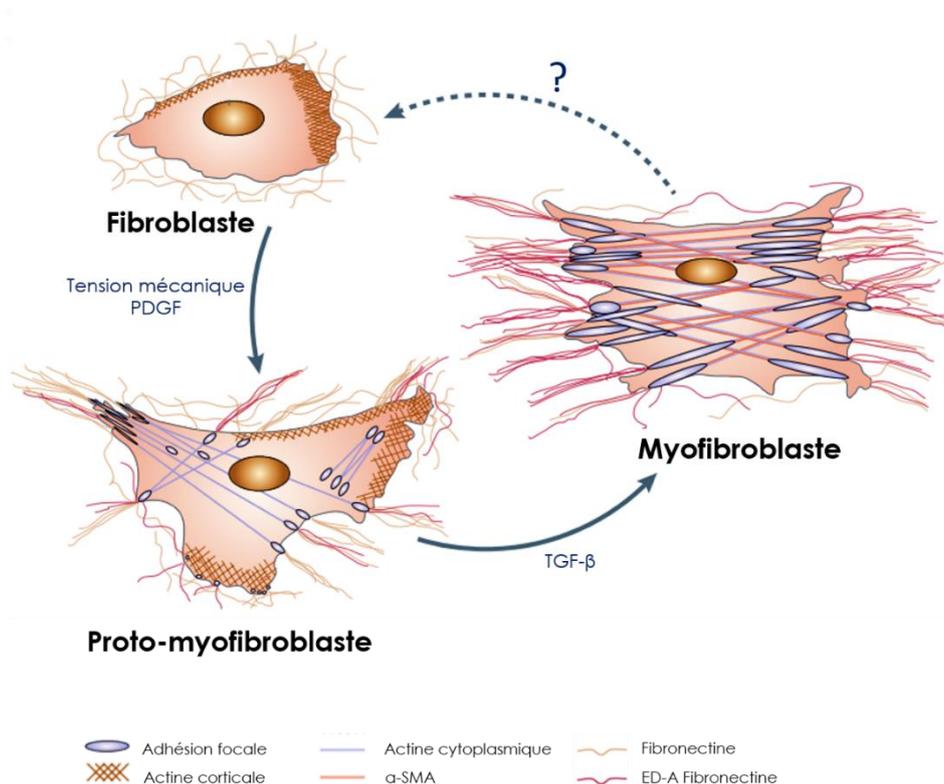
La transition endothélio-mésenchymateuse (*endoMT*) se caractérise par la transformation des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses (Xiao and Dudley, 2017). La participation de ce mécanisme au cours du processus de fibrose est également controversée. Cependant, certaines études ont montré dans plusieurs modèles expérimentaux que l'endoMT participerait à l'accumulation de myofibroblastes (Zeisberg *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2010).

#### **b. Activation des fibroblastes en myofibroblastes**

L'activation des fibroblastes en myofibroblastes se déroule en deux étapes, décrites en 2002 par Tomasek (**Figure 15**) (Tomasek *et al.*, 2002).

Dans un premier temps, les fibroblastes se différencient en proto-myofibroblastes sous l'effet de tension mécanique telle que la rigidité tissulaire et également sous l'effet du PDGF (Martin,

1997; Hinz *et al.*, 2001; Hinz, McCulloch and Coelho, 2019; Pakshir *et al.*, 2020). Les proto-myofibroblastes n'expriment pas l' $\alpha$ -SMA mais synthétisent de l'actine cytoplasmique, organisée en fibres de stress, et de la fibronectine (Tomasek *et al.*, 2002). Le TGF- $\beta$  et d'autres facteurs de croissance, permettent la différenciation des proto-myofibroblastes en myofibroblastes, induisant l'expression *de novo* de l' $\alpha$ -SMA et l'augmentation des fibres de stress (Roy, Nozaki and Phan, 2001; Tomasek *et al.*, 2002).



**Figure 15 : Mécanisme de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.** Les fibroblastes, sous l’effet de tension mécanique ou encore du PDGF, se différencient en proto-myofibroblastes. Ces derniers synthétisent de l’actine cytoplasmique, organisée en fibres de stress, et de la fibronectine. Sous l’effet du TGF-β (et d’autres facteurs de croissance), les proto-myofibroblastes se différencient en myofibroblastes. Les myofibroblastes expriment *de novo* l’actine alpha du muscle lisse (α-SMA). Le mécanisme de « désactivation » des myofibroblastes en fibroblastes est encore mal caractérisé. D’après Tomasek *et al.*, 2002.

### 3. Acteurs moléculaires du processus de fibrogenèse

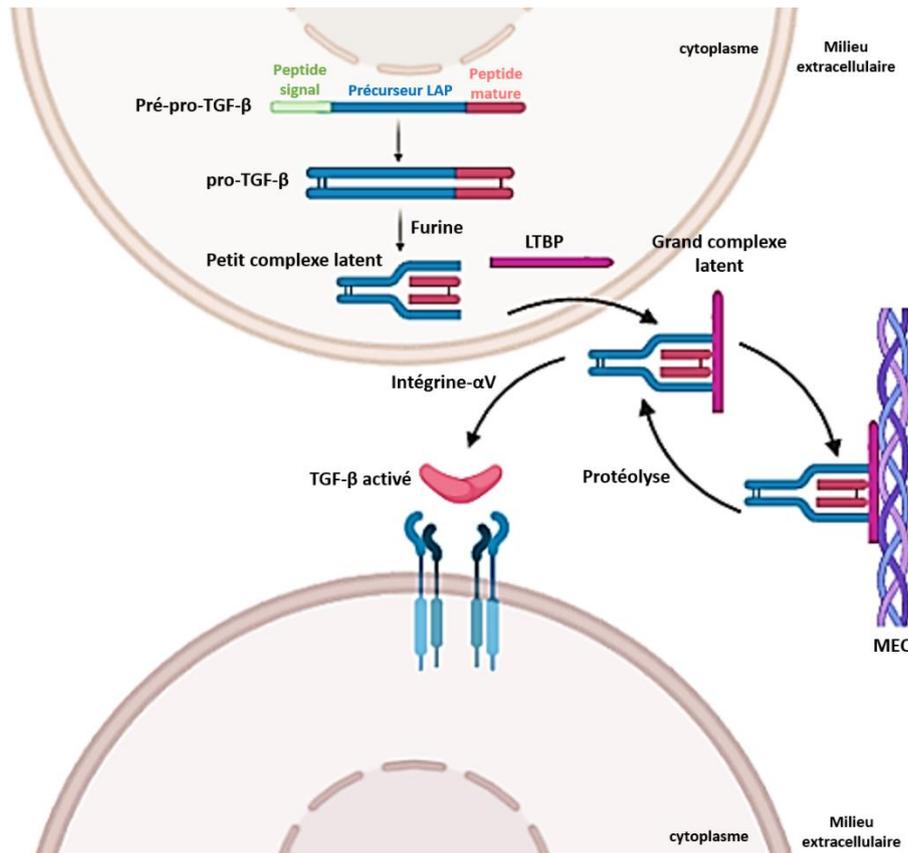
#### a. Voie de signalisation du TGF-β

Depuis les années 80 et la découverte du rôle du TGF-β1 dans la croissance des fibroblastes par Roberts *et al.*, plus de 40 membres de la superfamille du TGF-β ont été identifiés, dont les isoformes du TGF-β et les protéines BMP (Bone morphogenetic proteins) (Roberts *et al.*, 1981). Chez l’homme, les trois isoformes TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3 régulent de nombreux processus biologiques comme la prolifération cellulaire, l’inflammation, la différenciation, la migration, le développement embryonnaire, la cicatrisation ou le remodelage de la MEC (Nickel, Ten Dijke and Mueller, 2018; Verrecchia and Rédini, 2018). Le TGF-β participe également au processus de fibrose (Roberts *et al.*, 1981; Meng, Nikolic-Paterson and Lan, 2016; Higgins *et al.*, 2018).

Le TGF- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ) est la forme majoritaire principalement exprimée dans les cellules endothéliales, les cellules immunitaires (principalement les macrophages), les fibroblastes et d'autres cellules du tissu conjonctif (Clark and Coker, 1998; Chaikuad and Bullock, 2016; Meng, Nikolic-Paterson and Lan, 2016; Nickel, Ten Dijke and Mueller, 2018).

#### *i. Synthèse du TGF- $\beta$*

Le TGF- $\beta$  est synthétisé à partir du pré-pro-TGF- $\beta$ , précurseur inactif du TGF- $\beta$  constitué de trois domaines : le peptide signal, le domaine LAP (Latent Associated Protein) et la forme active du TGF- $\beta$ . La maturation du pré-pro-TGF- $\beta$  comporte trois étapes : le clivage du peptide signal, la dimérisation de deux unités « LAP-peptide mature » par la formation de ponts disulfure (Derynck and Budi, 2019) et enfin le clivage du peptide mature par une endopeptidase, la furine, qui résulte en la formation d'un complexe latent LTGF $\beta$  (Latency TGF- $\beta$ ) après liaison à une protéine LTBP (LTGF $\beta$  Binding Protein). Le complexe latent LTGF $\beta$  est ensuite exporté dans le milieu extracellulaire (Tandon *et al.*, 2010). Le complexe LTGF $\beta$  peut ainsi se lier à la MEC et constituer une réserve de TGF- $\beta$  qui pourra ainsi être activé par l'action des métalloprotéinases MMP2 et 9 (Yu and Stamenkovic, 2000; Costanza *et al.*, 2017), de plasmines (Yehualaeshet *et al.*, 1999; Costanza *et al.*, 2017), de la thrombospondine-1 (TSP-1) (Costanza *et al.*, 2017; Murphy-Ullrich and Suto, 2018) ou des intégrines  $\alpha$ V (Henderson *et al.*, 2013) (**Figure 16**).



**Figure 16 : Synthèse du TGF- $\beta$ .** Le TGF- $\beta$  est synthétisé à partir du pré-pro-TGF- $\beta$ . Son clivage par une furine et sa dimérisation entraînent la formation d'un petit complexe latent LTGF $\beta$  (Latency TGF- $\beta$ ). Ce complexe se lie au LTBP (LTGF $\beta$  Binding Protein) formant un grand complexe latent pouvant se lier à la matrice extracellulaire et constituer une réserve de TGF- $\beta$  latent. Cette réserve de TGF- $\beta$  est libérée par protéolyse. Le TGF- $\beta$  latent est activé par l'action différentes protéines dont des intégrines- $\alpha$ V.

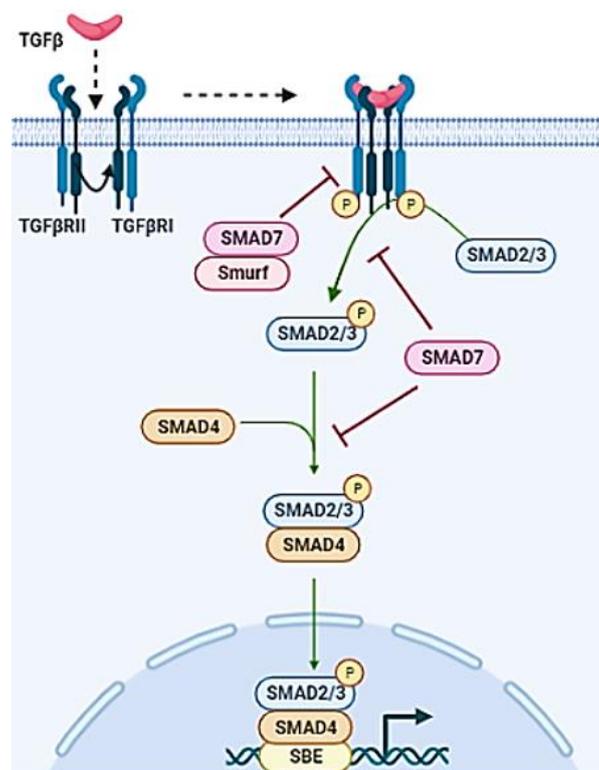
Bien que la synthèse du TGF- $\beta$  et l'expression de ses récepteurs soient ubiquitaires, son mode d'activation permet une action localisée (autocrine ou paracrine) (Shi *et al.*, 2011).

## ii. Voie de signalisation canonique du TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  exerce ses fonctions en se liant, sous sa forme activée sur les récepteurs TGF $\beta$ R1 et TGF $\beta$ R2, des récepteurs transmembranaires à activité kinase intrinsèque. La fixation du TGF- $\beta$  sur TGF $\beta$ R2 entraîne son autophosphorylation et le recrutement de TGF $\beta$ R1, formant ainsi un complexe hétéro-tétramérique. La transduction du signal est ensuite médiée par la phosphorylation des protéines Smad associées aux récepteurs R-Smad, Smad2 et Smad3. Ces derniers, lorsqu'ils sont phosphorylés, recrutent la protéine Smad4. Le complexe phospho-Smad2/3/4 activé transloque alors dans le noyau et peut se fixer sur l'élément de réponse SBE

(Smad Binding Element), afin de réguler la transcription de ses gènes cibles dont certains sont impliqués dans la fibrose (Akhurst and Hata, 2012; Tzavlaki and Moustakas, 2020), en particulier, les collagènes de type I et III ou TIMP-1 (Meng *et al.*, 2010). De manière intéressante, l'inhibition de Smad3 bloque le processus de TEM et atténue la fibrose rénale, l'inflammation et l'apoptose dans un modèle murin de fibrose rénale induite par obstruction urétérale unilatérale (Sato *et al.*, 2003).

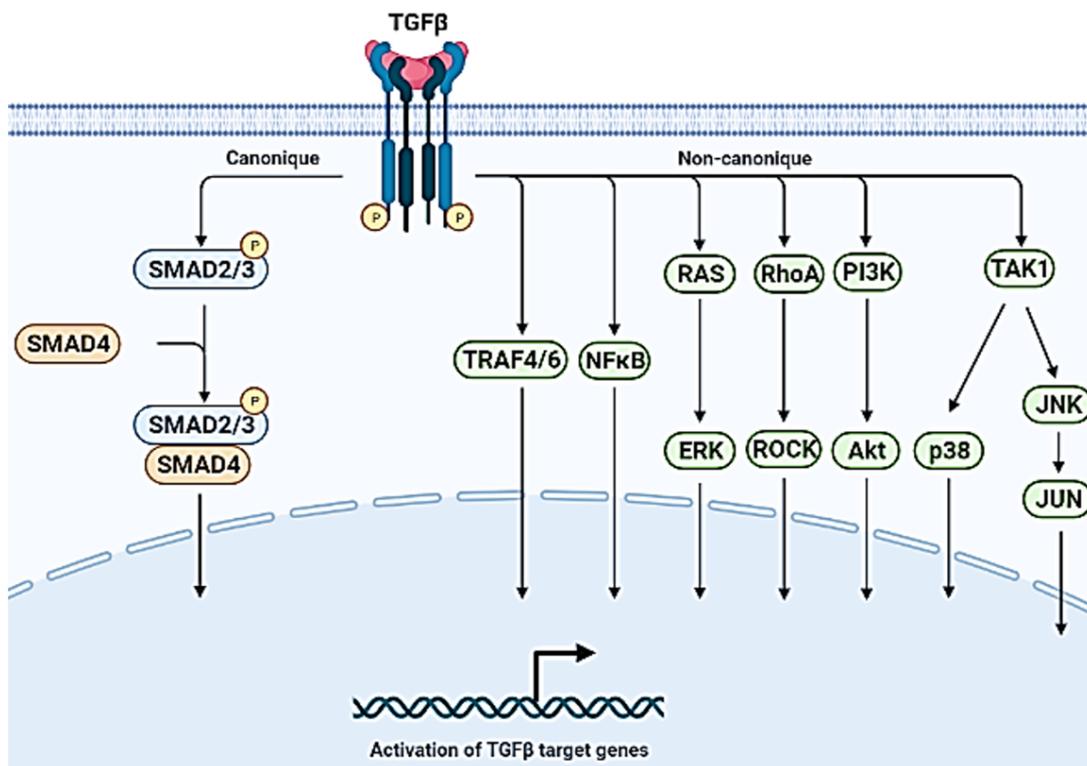
La voie de signalisation Smad-dépendante est régulée par Smad7, un inhibiteur des Smad qui module la voie de signalisation en (i) induisant la dégradation des récepteurs TGF $\beta$ RI et TGF $\beta$ RII grâce aux ubiquitines ligases SMURF1 et SMURF2 (Smad Ubiquitin Regulatory Factor) (Kavsak *et al.*, 2000; Ebisawa *et al.*, 2001), en (ii) inhibant la phosphorylation des Smad 2 et 3 par compétitivité (Kamiya, Miyazono and Miyazawa, 2010) ou en (iii) inhibant la formation du trimère formé par les Smad 2,3 et 4 par compétitivité avec Smad4 (Yan *et al.*, 2016) (**Figure 17**).



**Figure 17 : Voie de signalisation Smad-dépendante du TGF- $\beta$ .** La fixation du TGF- $\beta$  sur le récepteur TGF $\beta$ RII entraîne le recrutement et la phosphorylation du récepteur TGF $\beta$ RI formant ainsi un hétérodimère. Le signal est ensuite propagé par la phosphorylation du complexe formé par smad2 et smad3. Ce complexe ainsi phosphorylé forme un trimère grâce au recrutement de smad4. Le trimère est alors transloqué dans le noyau et se lie à l'élément de réponse SBE (Smad Binding Element) présent dans les régions promotrices des gènes cibles du TGF- $\beta$ . La protéine smad7 régule la transduction du signal en inhibant la phosphorylation du complexe Smad2/3 ou la formation du trimère avec smad4. De plus, en s'associant à la protéine Smurf, Smad7 induit la dégradation des récepteurs au TGF- $\beta$ .

### iii. Voies de signalisation non-canoniques du TGF- $\beta$

Outre la voie de signalisation Smad-dépendante, le TGF- $\beta$  peut également moduler d'autres voies de signalisation, dites « voies non-canoniques » (**Figure 18**) (Akhurst and Hata, 2012). A l'inverse de la voie Smad-dépendante et, excepté la voie ERK qui nécessite la phosphorylation de ShcA (Lee *et al.*, 2007), les voies de signalisation non-canoniques du TGF- $\beta$  ne dépendent pas de l'activité tyrosine-kinase du récepteur mais sont transduites par l'activation de différents complexes (Derynck and Budi, 2019). Par exemple, la fixation du TGF- $\beta$  sur son récepteur entraîne l'ubiquitinylation de TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) conduisant à l'activation de TAK1 (Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1) et de kinases en aval telles que JNK et p38 (Wang *et al.*, 2001; Zhang, 2017). Par ailleurs, l'interaction de la sous-unité p85 de PI3K (Phosphatidylinositol-3 Kinase) avec le récepteur TGF $\beta$ RI entraîne la phosphorylation et l'activation d'AKT (Yi, Shin and Arteaga, 2005)



**Figure 18 : Voies de signalisation du TGF- $\beta$ .** La liaison du TGF- $\beta$  à son récepteur, le complexe TGF- $\beta$  receptor I/II (TGF $\beta$ RI/II), déclenche une cascade de signalisation canonique (dépendante des protéines Smad) et non canonique faisant intervenir d'autres protéines. TGF- $\beta$  = Transforming Growth Factor  $\beta$  ; TRAF = TNF Receptor Associated Factor ; NF $\kappa$ B = Nuclear Factor  $\kappa$  B ; ERK = Extracellular signal-Reductase Kinase ; ROCK = Rho-associated protein Kinase ; PI3K = Phoshatidyl-Inositol 2 Phosphate ; TAK = Transforming growth factor beta-Activated Kinase ; JNK = c-Jun N-terminal Kinase.

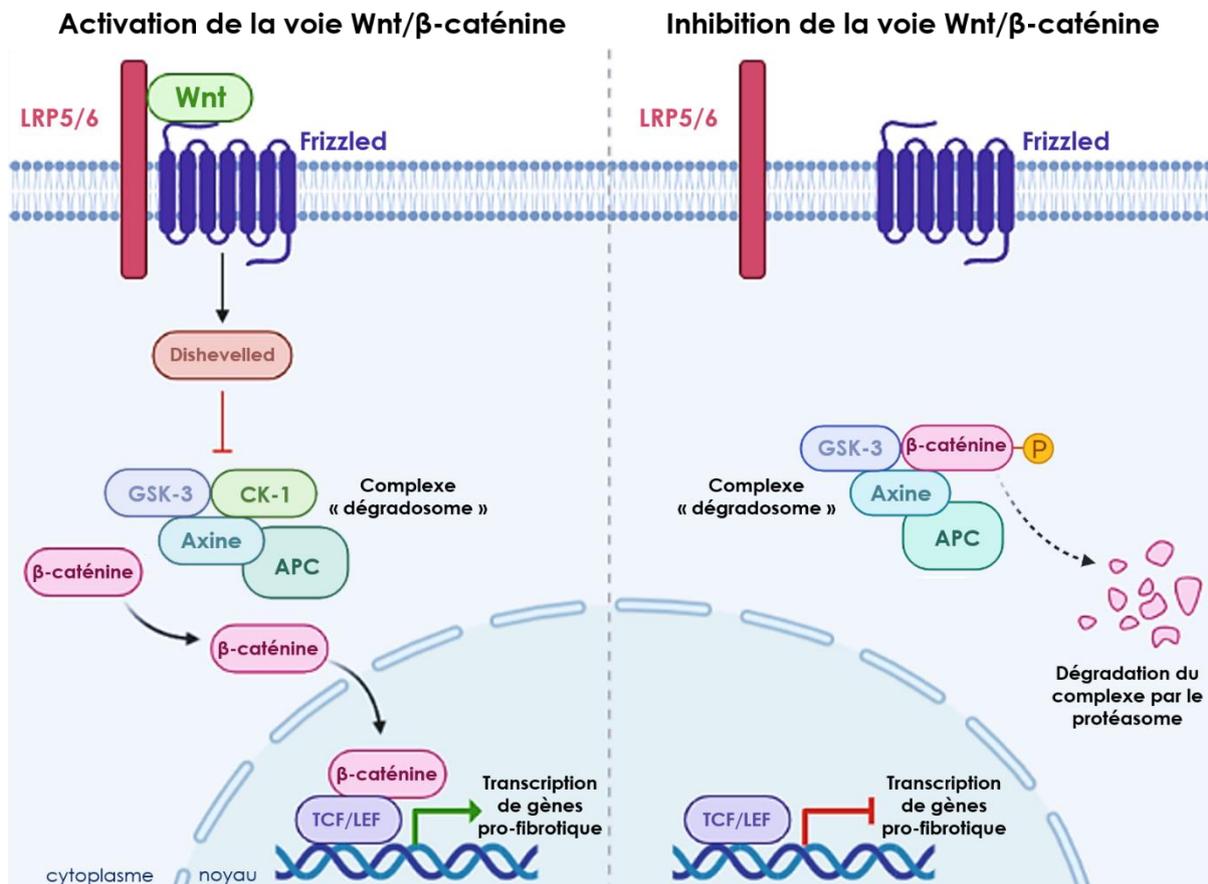
Les voies non-canoniques du TGF- $\beta$  participent également à la régulation de l'activation des fibroblastes et du processus de fibrogenèse. En effet, l'activation des voies des MAPK p38 et PI3K/Akt est impliquée dans la formation de la MEC, notamment dans le cadre de la fibrose hépatique (Tsukada *et al.*, 2005; N. Liu *et al.*, 2019). De plus, la voie de signalisation non canonique joue un rôle essentiel dans la régulation de la fibrose cardiaque. En agissant sur différents types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules vasculaires du muscle lisse et macrophages), la voie ROCK entraîne une augmentation de l'inflammation, régule la rigidité vasculaire, la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes ou encore augmente la production de la MEC dans les fibroblastes cardiaques (Yu *et al.*, 2020).

### **b. Autres voies de signalisation**

Bien que le TGF- $\beta$  soit l'acteur moléculaire majeur du processus de fibrogenèse, d'autres acteurs et voies de signalisation sont également impliqués dans le processus de fibrose.

En particulier, la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, qui est essentielle au développement des organes et des tissus (Stark *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2002). Les mécanismes et facteurs de transcription responsables de l'expression du gène Wnt sont encore très peu connus. Les mécanismes découlant de sa traduction sont par contre mieux décrits. En effet, la protéine Wnt immature subit une palmitoylation post-traductionnelle avant d'être excrétée dans le milieu extracellulaire sous sa forme mature grâce à la protéine transmembranaire Evi (Evenness Interrupted). En l'absence de ligand Wnt sur le récepteur frizzled (FZD), la  $\beta$ -caténine est phosphorylée par GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) et / ou CK-1 (Casein Kinase 1) qui sont des protéines appartenant à un complexe appelé « dégradosome » composé de plusieurs partenaires protéiques (GSK-3, CK-1, axine et APC), conduisant à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Aberle *et al.*, 1997; Burgy and Königshoff, 2018). En présence de ligand Wnt, le récepteur FZD forme un complexe avec LRP5 ou LRP6 (Lipoprotein Receptor-related Protein) conduisant à la polymérisation de Dishevelled, permettant à son tour le recrutement du complexe dégradosome de la  $\beta$ -caténine. Ce recrutement entraîne l'inhibition de GSK-3 par LRP6 (Clevers, 2006; Burgy and Königshoff, 2018). La  $\beta$ -caténine s'accumule ainsi dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau dans lequel elle induit la transcription de gènes pro-fibrotiques en s'associant aux facteurs de transcription TCF/LEF (T-cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor) (Behrens *et al.*, 1996; Clevers, 2006; Burgy and

Königshoff, 2018) (**Figure 19**). Par ailleurs, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine peut également être induite par le TGF- $\beta$  suite à l'activation de la voie PI3K/AKT par phosphorylation de GSK-3 (Lin, Wang and Kao, 2014).



**Figure 19 : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.** La fixation du ligand Wnt sur le récepteur frizzled entraîne l'inhibition du complexe « dégradosome ». Ainsi, la  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau où elle peut se lier aux facteurs de transcription TCF/LEF permettant la transcription de gènes pro-fibrotiques. A l'inverse, l'absence de ligand Wnt sur le récepteur frizzled, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée par GSK-3 conduisant à son ubiquitination et sa dégradation dans le protéasome.

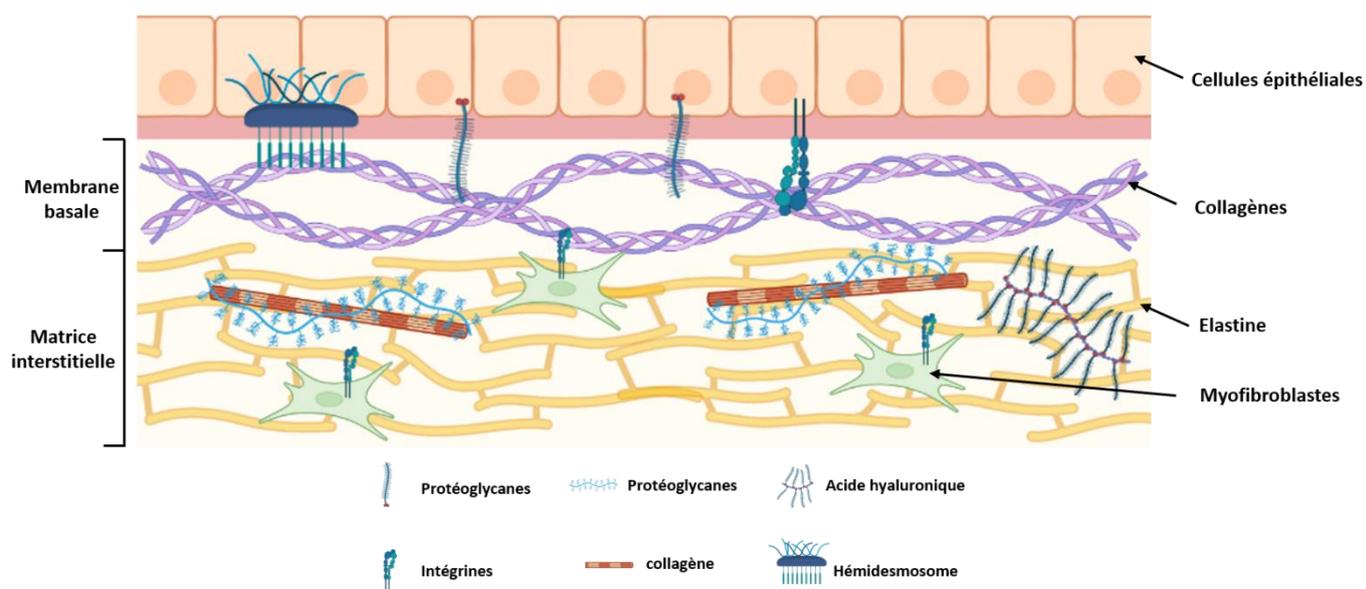
La voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle important dans le processus de fibrose tissulaire, notamment cardiaque (Tao *et al.*, 2016), pulmonaire (Lv *et al.*, 2020), hépatique (Duspara *et al.*, 2021), rénale (Pan *et al.*, 2021) ou encore cutanée (M. Li *et al.*, 2021). En particulier, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Liu *et al.*, 2021), la migration, la prolifération (Lam *et al.*, 2011) et la production de la MEC, notamment du collagène et des métalloprotéinases (Svegliati *et al.*, 2014; Hamburg-Shields *et al.*, 2015).

#### 4. Matrice extracellulaire (MEC)

Le processus de fibrose se caractérise par une activation accrue des fibroblastes en myofibroblastes sous l'influence du TGF- $\beta$  à l'origine de la production et du dépôt des constituants de la MEC (Akhurst and Hata, 2012).

La matrice extracellulaire (MEC) représente le constituant biochimique du tissu conjonctif et est composé de protéines nombreuses et variées. Plus de 300 protéines ont ainsi été identifiées chez les mammifères et regroupent 43 types de collagène, plus de 200 glycoprotéines (dont font partie la fibronectine et la laminine) et 36 types de protéoglycanes (Hynes and Naba, 2012; Theocharis *et al.*, 2012, 2016).

La composition de la MEC varie selon les tissus, ce qui affecte leur structure et leurs propriétés (Theocharis *et al.*, 2012). De plus, on distingue deux types de matrice : la matrice interstitielle et la matrice péricellulaire (Theocharis *et al.*, 2016). Par exemple, la membrane basale, un type de matrice péricellulaire, se situe à l'interface entre le parenchyme et le tissu conjonctif et est constituée de collagène de type IV, laminine, nidogènes 1 et 2 et de protéoglycanes (LeBleu, MacDonald and Kalluri, 2007). La membrane basale participe à l'adhésion des cellules épithéliales et stabilise la structure tissulaire grâce au collagène IV et aux hémidesmosomes (Paulsson, 1992; Halfter *et al.*, 2015; Theocharis *et al.*, 2016). Quant à la matrice interstitielle, elle est majoritairement constituée de collagène de type I et de fibronectine qui participent au renforcement de la structure tissulaire. On retrouve également de l'élastine, des protéoglycanes et des glycoprotéines (Bonnans, Chou and Werb, 2014; Halfter *et al.*, 2015) (**Figure 20**).



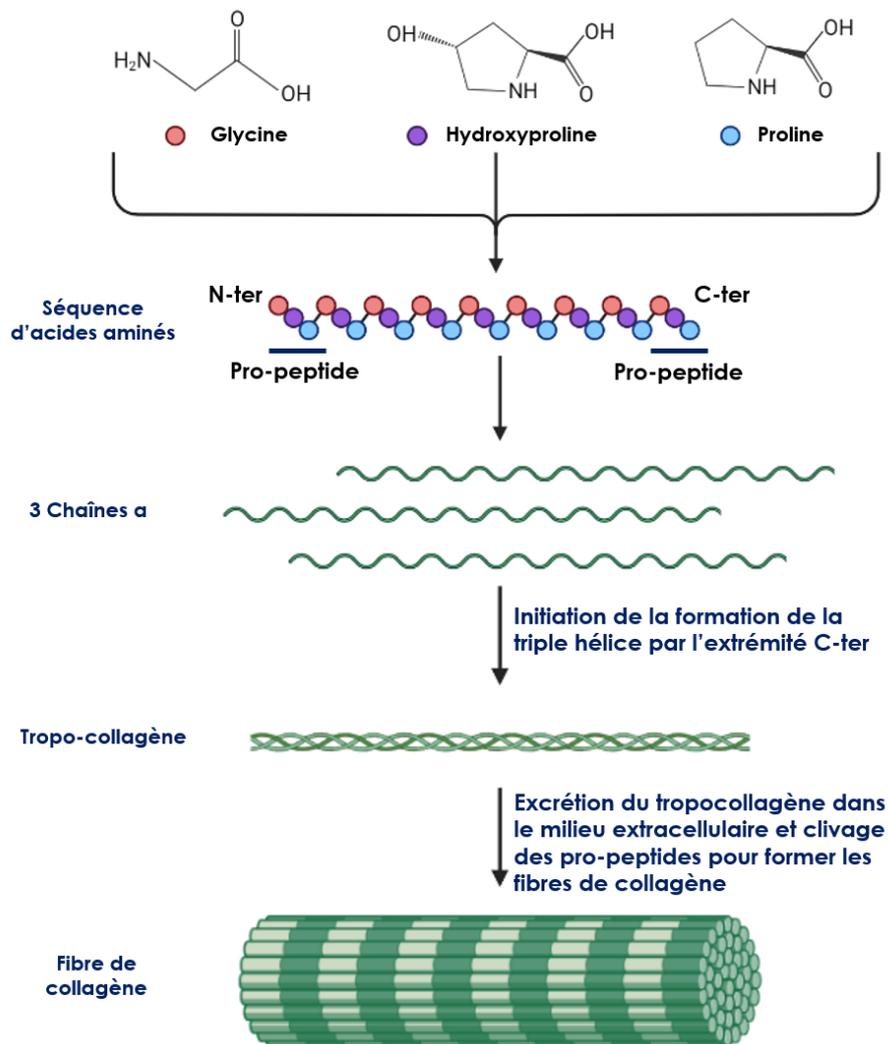
**Figure 20 : Organisation et composition de la MEC.** Au sein de la MEC, on distingue deux types de matrice : la membrane basale et la matrice interstitielle. Les cellules épithéliales sont ancrées dans la membrane basale grâce aux hémidesmosomes, à des protéoglycanes et aux intégrines. La membrane basale est principalement constituée de collagène de type IV, Laminine, Nidogènes et de protéoglycanes. La matrice interstitielle est constituée de collagène de type I, fibronectine, élastine, protéoglycanes et glycosaminoglycanes. Les myofibroblastes communiquent avec cette matrice par l'intermédiaire d'intégrines présentes à leur surface.

De manière physiologique mais aussi en conditions pathologiques, le remodelage de la MEC est médiée par diverses enzymes comme les métalloprotéinases de type MMP (Lu *et al.*, 2011) et de type ADAM (A Desintegrin Metalloproteases) (White, 2003), des inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMP) (Khokha, Murthy and Weiss, 2013), des méprines (Kruse *et al.*, 2004) et des activateurs de plasminogènes (Smith and Marshall, 2010).

### a. Les collagènes

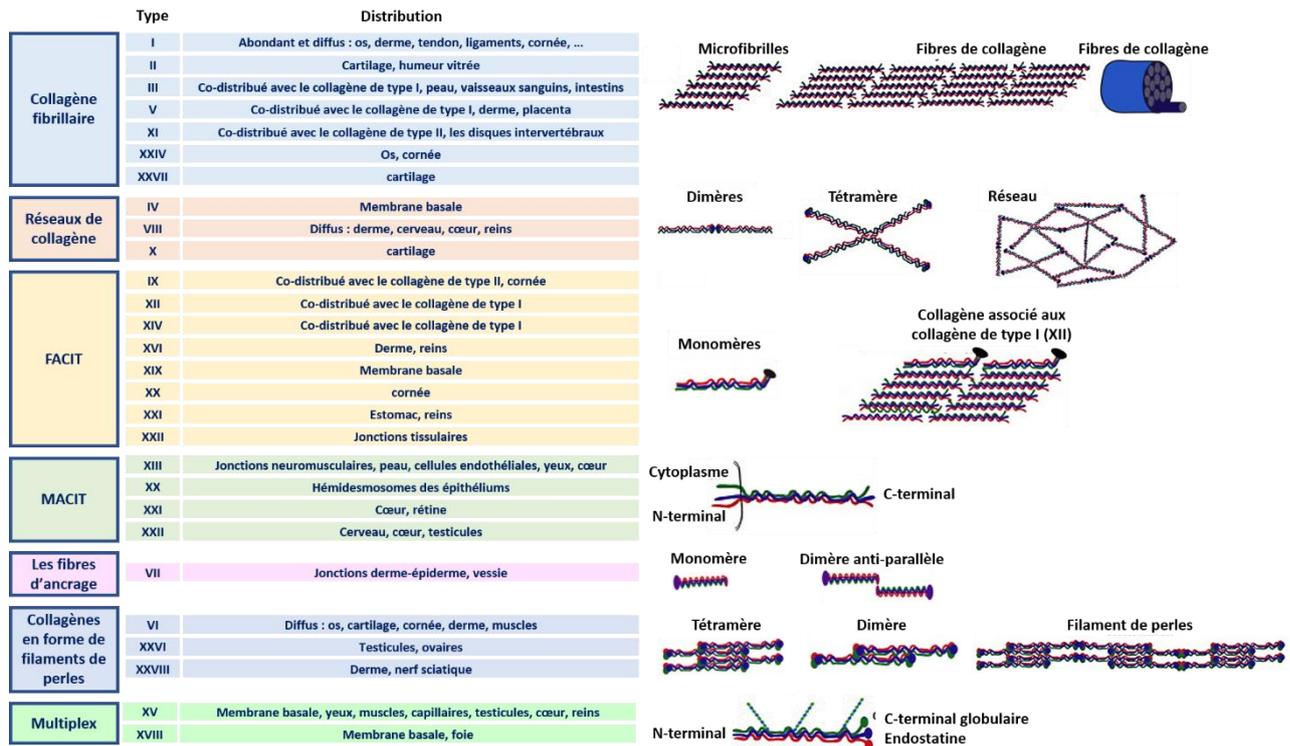
Le collagène est la protéine la plus abondante dans la matrice interstitielle et est également un constituant majoritaire des membranes basales (Kadler *et al.*, 2007). Le collagène, qui représente près de 30% des protéines chez l'homme, est synthétisé principalement par les fibroblastes et est souvent organisé en fibres ou en réseaux (Frantz, Stewart and Weaver, 2010; Fidler *et al.*, 2018). La famille des collagènes contient 28 types différents, formés à partir d'au moins une cinquantaine de chaînes polypeptidiques chez les vertébrés (Heino, 2007). Chaque type de collagène présente une organisation, des propriétés et une distribution tissulaire spécifiques (Theocharis *et al.*, 2016). Chaque type de collagène est constitué de trois

chaînes  $\alpha$ , dont un domaine est organisé en triple hélice (Shoulders and Raines, 2009). Les chaînes  $\alpha$  comprennent un segment de longueur variable constitué de la répétition du motif Glycine-X-Y où X et Y sont généralement et respectivement une proline et une 4-hydroxyproline (Shoulders and Raines, 2009; Kirkness, Lehmann and Forde, 2019) (**Figure 21**).



**Figure 21 : Structure et formation des fibres de collagène.** Le collagène est formé à partir d'une séquence d'acides aminés généralement constituée de Glycine-Hydroxyproline-Proline flanquée par des pro-peptides en région N-terminal et C-terminal. Ainsi, trois chaînes  $\alpha$  sont assemblées en une triple hélice à partir de l'extrémité C-terminal. Le tropo-collagène ainsi formé est sécrété dans le milieu extracellulaire. Enfin, les pro-peptides sont clivés par des métalloprotéinases favorisant la formation de fibres de collagène.

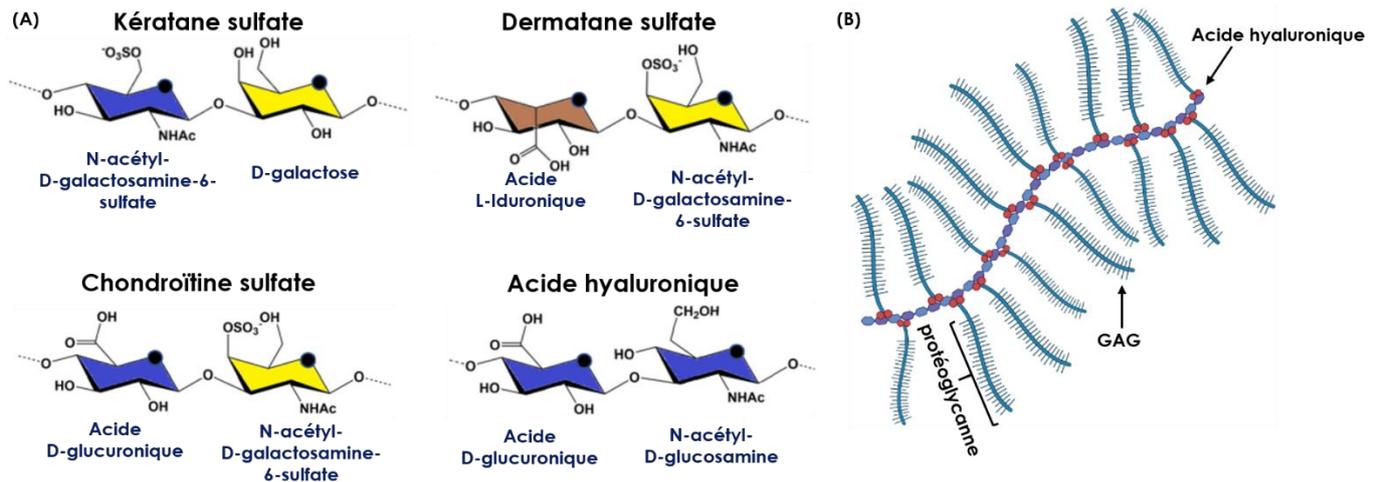
La superfamille des collagènes peut être divisée en 7 catégories dont le collagène fibrillaire, quantitativement majoritaire (Shoulders and Raines, 2009). Le collagène fibrillaire comprend les collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII que l'on retrouve dans les tissus où s'exerce une force de traction, principalement la peau (Haverkamp *et al.*, 2022), les tendons (Zhang *et al.*, 2005) ou encore le cartilage (Wu *et al.*, 2010) (**Figure 22**). Parmi les collagènes fibrillaires, le collagène de type I (COL1) est le plus abondant chez les vertébrés. COL1 participe à la structure tissulaire et à la résistance mécanique des tissus et des organes (Sheehy *et al.*, 2020). Il est notamment présent au niveau de la membrane basale, des ligaments, des tendons, de la peau, des vaisseaux sanguins, ou encore des os (Varma, Orgel and Schieber, 2016; Naomi, Ridzuan and Bahari, 2021). La production de collagène est nécessaire au processus de réparation tissulaire, et par conséquent, à l'initiation et la progression de la fibrose (Wen *et al.*, 2016). En effet, dans un contexte fibrotique, les fibroblastes activés (myofibroblastes) produisent en quantité excessive les composants de la matrice extracellulaire, majoritairement les collagènes de type I et III (MacKenna, 2000). Parmi les collagène produits par les fibroblastes activés, le collagène de type I représente à lui seul près de 80% des collagènes synthétisés (MacKenna, 2000).



**Figure 22 : Classification, organisation, distribution et structure des différents types de collagène.** La super-famille des collagènes est divisée en 7 catégories de collagène selon leur composition, leur organisation, leur distribution tissulaire et enfin leur structure quaternaire. On distingue ainsi : les fibres de collagène, les réseaux de collagène, les FACIT (Collagènes Associés à des Fibrilles avec des Triples hélices), les MACIT (Collagènes Associés à la Membrane avec des Triples hélices), les fibres d'ancrage, les collagènes en forme de filaments de perles et les multiplex. D'après Theocharis *et al.*, 2016.

## b. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont constitués d'un noyau protéique sur lequel sont liées de manière covalente plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG), généralement sulfatées. Les GAG sont constitués de la répétition d'un motif disaccharidique composé d'une hexosamine (glucosamine ou galactosamine) et d'un autre ose (acide glucuronique, acide iduronique ou galactose) (Theocharis *et al.*, 2010, 2016). La chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate et l'acide hyaluronique sont des exemples de GAG communs (Theocharis *et al.*, 2010) (Figure 23).



**Figure 23 : Composition et structure des protéoglycans.** (A) Exemple de glycosaminoglycans constitutifs des protéoglycans ; (B) Les protéoglycans, organisés autour d'une chaîne d'acide hyaluronique, sont constitués de nombreuses chaînes de glycosaminoglycans. PG = protéoglycans ; GAG = glycosaminoglycans.

Au niveau de la MEC, les PG participent à de nombreux processus cellulaires, dont la signalisation cellulaire, la prolifération, la migration, la différenciation, l'apoptose ou encore l'adhésion cellulaire, en interagissant avec des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines, mais également avec des protéines de surface et d'autres composants de la MEC (Theocharis *et al.*, 2010, 2014; Iozzo and Sanderson, 2011) et jouent ainsi un rôle important dans la structuration de la MEC (Iozzo and Sanderson, 2011).

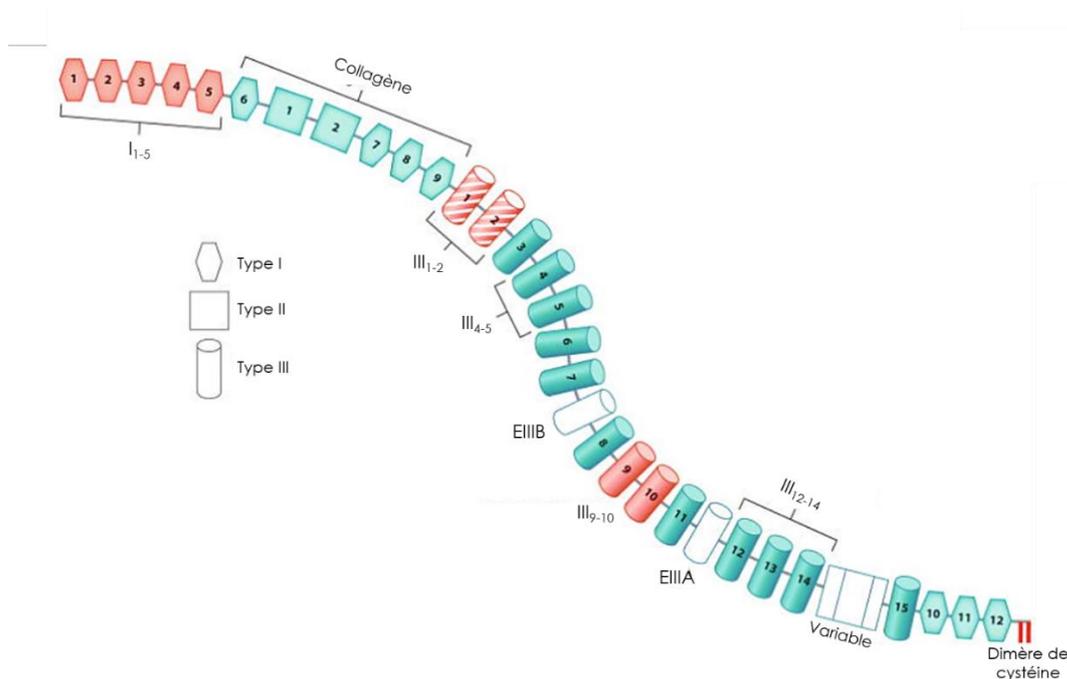
### c. Les glycoprotéines de structure

#### i. Généralités

On dénombre plus de 200 glycoprotéines de structures variées participant à la structuration de la MEC et l'ancrage des cellules à la MEC. La plupart des glycoprotéines sont multimériques et constituées de plusieurs domaines d'interaction ou de liaison avec les constituants de la MEC ou des récepteurs à la surface des cellules comme les intégrines (Hynes, 2009; Hynes and Naba, 2012). La plupart des glycoprotéines restent partiellement caractérisées à l'heure actuelle. Parmi les glycoprotéines les plus étudiées, on retrouve la fibronectine ubiquitaire et la laminine, spécifique des membranes basales (Bülöw and Boor, 2019).

## ii. Les fibronectines

Les fibronectines sont les glycoprotéines de structure les plus abondantes et ubiquitaires de la MEC et jouent un rôle biologique important et varié dans le développement (George *et al.*, 1993), la prolifération (Han and Roman, 2006), la différenciation (VanSlyke, Boswell and Musil, 2018), la migration (Gui *et al.*, 2006) et la cicatrisation (Bielefeld *et al.*, 2011), principalement par des voies de signalisation dépendantes des intégrines (Hynes, 1992, p. 199). La fibronectine est une protéine dimérique très conservée constituée de deux monomères similaires, de 220 et 250 kDa, reliés par deux ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. Chaque monomère est constitué de 3 modules distincts, dénommés types I, II et III (Hynes, 1986; Singh, Carraher and Schwarzbauer, 2010) (**Figure 24**).



**Figure 24 : Structure d'un monomère de fibronectine.** Chaque monomère de fibronectine s'organise à partir de trois sous-unités : type I, type II et type III. Les régions I<sub>1-5</sub>, III<sub>1-2</sub> et III<sub>9-10</sub> ainsi que le dimère de cystéine sont nécessaires à l'assemblage de la fibronectine. La région III<sub>1-2</sub> possède des sites de liaison à la fibronectine et participe aux changements de conformation. Il existe d'autres sites de liaison aux autres constituants de la MEC (collagène, héparine, fibronectine) au niveau des régions « collagène », III<sub>4-5</sub> et III<sub>12-14</sub>. Les régions EIII A et EIII B sont des domaines issus de l'épissage alternatif. D'après Singh, Carraher and Schwarzbauer, 2010.

Bien qu'un seul gène code la fibronectine, une vingtaine de variants issus de l'épissage alternatif ont été identifiés chez l'homme (Kosmehl, Berndt and Katenkamp, 1996). La fibronectine cellulaire s'organise sous forme de fibres d'une taille comprise entre une dizaine de nanomètres et une dizaine de micromètres (Davidson, Keller and DeSimone, 2004).

Divers stimuli entraînent la production de fibres de fibronectine, notamment lors du remodelage tissulaire en cas d'agression chronique et au cours du développement embryonnaire (Patten and Wang, 2021). La fibronectine participe également à la progression tumorale (Wan *et al.*, 2013; Ghura *et al.*, 2021). De plus, la fibronectine est capable d'interagir avec la partie LTBP du TGF- $\beta$  latent afin de constituer une réserve de TGF- $\beta$  inactive (Rifkin, 2005; Hynes, 2009).

## II. La Fibrose hépatique

La fibrose hépatique survient après une lésion chronique ou une inflammation hépatique d'étiologies variées. En effet de nombreuses maladies hépatiques inflammatoires peuvent, en l'absence de traitement efficace, causer une fibrose telles qu'une hépatite auto-immune ou virale (hépatite B et C), l'excès de consommation d'alcool, une maladie du foie gras non alcoolique (foie gras non alcoolique et stéato-hépatite non alcoolique), une obstruction biliaire, une cholangite biliaire primitive ou encore une hémochromatose (Marcellin and Kutala, 2018; Parola and Pinzani, 2019). A terme, les lésions de fibrose peuvent engager le pronostic fonctionnel hépatique et le pronostic du patient, nécessitant dans les stades avancés, le recours à la transplantation hépatique. A un stade avancé la fibrose conduit en effet à la cirrhose (Asrani *et al.*, 2019) ou à un hépatocarcinome dans 5 à 30% des cas (El-Serag, 2011; Moon *et al.*, 2019).

### 1. Aspects cliniques

#### a. Epidémiologie

Les maladies chroniques du foie (MCF) représentent un problème de santé publique majeur. En effet, dans le monde, plus de 800 millions de personnes sont atteintes d'une MCF avec 2 millions de décès par an, toutes étiologies confondues (Byass, 2014). Alors que les infections virales hépatiques sont prédominantes dans les pays africains, asiatiques et sud-américains, ce sont les maladies chroniques liées à une consommation excessive d'alcool ou un désordre métabolique telles que la NASH (Non Alcoholic SteatoHepatitis) et NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) qui sont majoritaires dans les pays occidentaux (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017; Marcellin and Kutala, 2018) (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Epidémiologie des maladies chroniques du foie dans le monde en 2016.

Etiologie	Incidence (millions)	Prévalence (%)	Estimation (millions)
Hépatite B	4,5 à 6	3,6	240
Hépatite C	3 à 4	2,5	170
Consommation d'alcool	16,6	4,5	Pas disponible
NAFLD	13,6	5 à 8	570
NASH	2,5	3 – 5	145

D'après Marcellin and Kutala, 2018. NAFLD = Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NASH = Non-Alcoholic SteatoHepatitis.

## b. Diagnostic

Bien que le meilleur moyen de diagnostiquer une fibrose hépatique reste la biopsie, cette méthode est peu utilisée. En effet, cette méthode est invasive et présente des risques de complications élevés comme le risque hémorragique (Bedossa, Dargère and Paradis, 2003). De plus, la petite taille d'une biopsie par rapport à la taille du foie est à l'origine de faux négatifs (Bedossa, Dargère and Paradis, 2003). C'est pourquoi de nombreux moyens de diagnostic non invasifs ont été développés afin de limiter les recours à la biopsie.

### i. Le scoring

Plusieurs méthodes de scoring ont été développées afin d'estimer les stades de fibrose : F0-2 (faible risque de fibrose), F3-4 (fibrose avancée) et F4 (cirrhose) (Lai and Afdhal, 2019). Les méthodes de scoring, parmi lesquelles on distingue le score NFS (Nonalcoholic Fatty liver disease Fibrosis score) (Angulo *et al.*, 2007; Lai and Afdhal, 2019), le score FIB-4 (Fibrosis-4) (Shah *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014) et le score APRI (Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index) (Wai *et al.*, 2003), sont basées sur des formules empiriques prenant en compte diverses variables (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : Principales méthodes de scoring utilisées pour déterminer les stades de fibrose.**

Score	NFS	FIB-4	APRI
<b>Etiologies</b>	NAFLD	NAFLD, Hépatite B et Hépatite C	NAFLD, Hépatite B et Hépatite C
<b>Variables</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Age</li> <li>- Indice de Masse Corporelle</li> <li>- Indice glycémique</li> <li>- Numération plaquettaire</li> <li>- Dosage de l'albumine</li> <li>- Ratio ASAT/ALAT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Age</li> <li>- Numération plaquettaire</li> <li>- ASAT</li> <li>- ALAT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ASAT</li> <li>- Numération plaquettaire</li> </ul>

NFS = Non-alcoholic Fatty liver disease Fibrosis score ; FIB-4 = Fibrosis-4 ; APRI = Aspartate aminotransferase to Platelet Ratio Index ; NAFLD = Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; ASAT = Aspartate AminoTransferase ; ALAT = Alanine AminoTransferase.

### ii. Panel de biomarqueurs

Différents panels basés sur le dosage de marqueurs sanguins ont également été mis en place. On distingue ainsi le panel ELF (Enhanced Liver Fibrosis) (Rosenberg *et al.*, 2004), l'hépascore (Adams *et al.*, 2005) et le fibrotest (Angulo *et al.*, 2013) présentés **tableau 7**.

**Tableau 7 : Panels de biomarqueurs sanguins utilisés pour déterminer les stades de fibrose.**

Panel	ELF	Hépascore	Fibrotest
<u>Variables mesurées</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Acide hyaluronique</u></li> <li>- <u>TIMP-1</u></li> <li>- <u>Peptide N-terminal du procollagène III</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Age</u></li> <li>- <u>Sexe</u></li> <li>- <u>Bilirubine</u></li> <li>- <u>GGT</u></li> <li>- <u>Acide hyaluronique</u></li> <li>- <u><math>\alpha</math>2-macroglobuline</u></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Age</u></li> <li>- <u>Sexe</u></li> <li>- <u>Bilirubine</u></li> <li>- <u>GGT</u></li> <li>- <u>Acide hyaluronique</u></li> <li>- <u><math>\alpha</math>2-macroglobuline</u></li> <li>- <u>haptoglobine</u></li> <li>- <u>Apolipoprotéine A1</u></li> </ul>

TIMP-1 = Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1 ; GGT = Gamma-Glutamyl Transferase.

### iii. Le Fibroscan

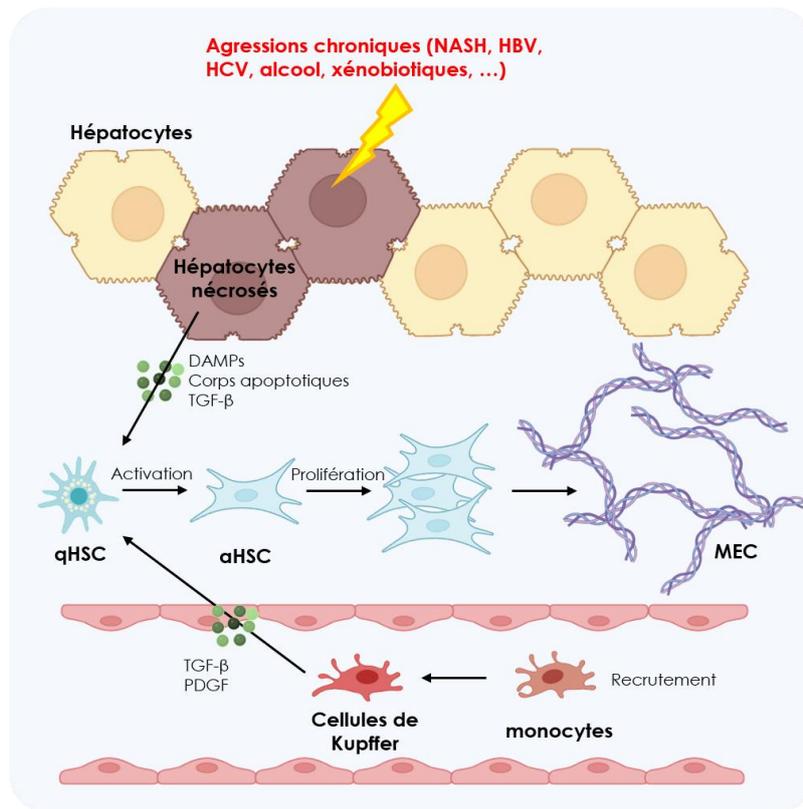
Le fibroscan est une méthode d'échographie développée en 2003 permettant de mesurer la vitesse des ondes de cisaillement à l'aide d'un transducteur ultrasonique (Sandrin *et al.*, 2003). La vitesse de propagation des ondes reflète la rigidité tissulaire. Plus précisément, plus l'onde se propage rapidement, plus le tissu est rigide et fibreux (Sandrin *et al.*, 2003; Fraquelli *et al.*,

2007). Le fibroscan est une technique très sensible qui permet de différencier les différents stades de fibrose. En effet, Tsochatzis *et al.*, (2011) ont déterminé des seuils de vitesse en fonction des stades de fibrose à partir d'une méta-analyse.

## **2. Mécanismes de fibrose hépatique**

Les MCF sont à l'origine d'un processus de cicatrisation aberrant conduisant au développement de la fibrose hépatique, caractérisée par l'accumulation des constituants de la MEC et la substitution progressive du parenchyme hépatique par du tissu fibreux (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Bien que les mécanismes de fibrose hépatique soient similaires quelle qu'en soit l'étiologie, différents schémas de progression de la fibrose ont été décrits. En effet, la localisation des lésions de fibrose et l'origine des cellules fibrogéniques varient selon l'étiologie (Cassiman *et al.*, 2002). Par exemple, dans le cadre d'une hépatite B ou C, les lésions de fibrose forment un pontage entre la veine porte et la veine centrale alors que dans le cadre d'une obstruction des voies biliaires, les lésions de fibrose se développent autour des canaux biliaires (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

L'agression hépatique conduit à l'activation des cellules mésenchymateuses résidentes en myofibroblastes. En particulier, les cellules stellaires (HSC) situées au niveau de l'espace de Disse, entre les cellules endothéliales et les hépatocytes, jouent un rôle prépondérant (Friedman, 2008) (**Figure 25**).

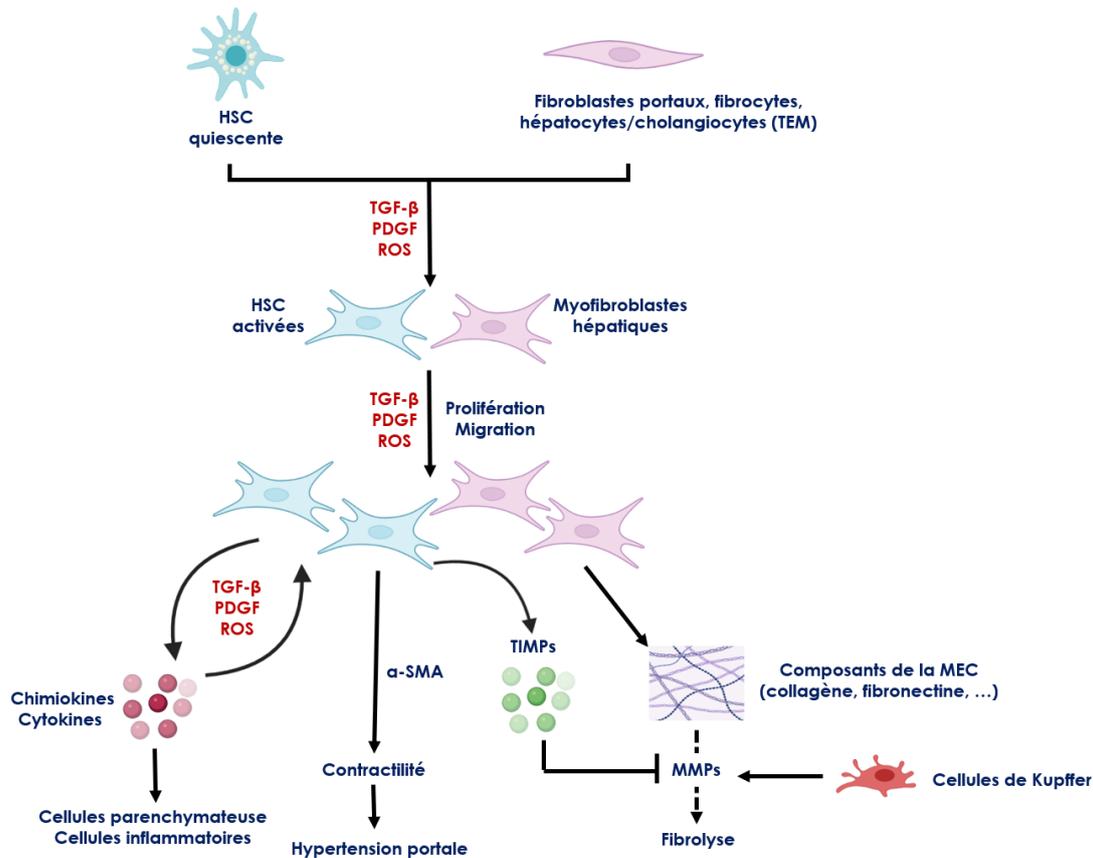


**Figure 25 : Mécanisme de fibrose hépatique.** Les maladies chroniques du foie entraînent des dommages au niveau des hépatocytes, induisant le recrutement de cellules immunitaires. Les cellules immunitaires, principalement des neutrophiles et des macrophages sécrètent des cytokines, chimiokines et des ROS entraînant l'activation des cellulaires stellaires. Ces dernières acquièrent un phénotype myofibroblastique et sécrètent les composants de la MEC. Un déséquilibre entre production (par les TIMP) et dégradation (par les MMP) de la MEC est à l'origine d'une fibrose hépatique. DAMP = Damage-Associated Molecular Patterns ; qHSC = quiescente Hepatic Stellate Cells ; aHSC = activated Hepatic Stellate Cells ; PDGF = Platelet-Derived Growth Factor ; TGF- $\beta$  = Transforming Growth Factor  $\beta$  ; MEC = Matrice Extra-Cellulaire ; HBV = Virus de l'Hépatite B ; HCV = Virus de l'Hépatite C ; NASH = Non Alcoholic SteatoHepatitis ; TIMP = Tissu Inhibitor of MetalloProteinase ; MMP = Matrix MetalloProteinase.

Après activation, les HSC perdent leur contenu en vitamine A, acquièrent une capacité accrue de prolifération, de contraction, de migration, et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques ainsi que de composants de la MEC (Friedman, 2008). L'activation des HSC est principalement médiée par le TGF- $\beta$  et le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor (Roehlen, Crouchet and Baumert, 2020).

Bien que les HSC représentent la première source de cellules fibrogéniques hépatiques (Friedman, 2010; Mederacke *et al.*, 2013), l'implication d'autres types cellulaires fibrogéniques a été démontrée, en particulier (i) les fibroblastes portaux (cellules mésenchymateuses portales) (Kisseleva, 2017; Lei *et al.*, 2022) ; (ii) les fibrocytes (Baba *et al.*,

2004; Mallat and Lotersztajn, 2009); (iii) les cellules épithéliales (hépatocytes et cholangiocytes) grâce au processus de TEM (Yu *et al.*, 2018) (Figure 26).



**Figure 26 : Origine et principales propriétés des cellules fibrogéniques hépatiques.** Au niveau hépatique, l'origine des cellules fibrogéniques est diverse. Les cellules majoritairement impliquées dans le processus de fibrose sont les cellules stellaires. Les myofibroblastes hépatiques peuvent également dériver des fibroblastes portaux, des fibrocytes ou encore des hépatocytes et des cholangiocytes grâce à la TEM. A titre d'exemple, sous l'effet de diverses agressions chroniques, les cellules stellaires quiescentes (qHSC) sont activées par le TGF-β, le PDGF ou encore les ROS et acquièrent des propriétés prolifératives et migratoires. Les myofibroblastes expriment l'α-SMA leur conférant des propriétés contractiles, sécrètent des TIMP et les composants de la MEC. Les cellules de Kupffer sécrètent des métalloprotéinases pour dégrader la MEC ainsi produite. HSC : Cellules Stellaires ; TGF-β : Transforming Growth Factor ; PDGF : Platelet-Derived Growth Factor ; ROS : Espèces Réactives à l'Oxygène ; α-SMA : Actine alpha du muscle lisse ; TIMP : Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases ; MMP : Métalloprotéinases matricielles ; MEC : Matrice Extracellulaire ; TEM = Transition Epithélio-Mésenchymateuse.

### 3. Réversibilité de la fibrose hépatique et solutions thérapeutiques

Les options thérapeutiques proposées pour le traitement de la fibrose hépatique sont limitées à l'heure actuelle. La solution thérapeutique la plus utilisée reste le traitement de la cause (Lee, Wallace and Friedman, 2015; Altamirano-Barrera, Barranco-Fragoso and Méndez-Sánchez, 2017), bien que la transplantation hépatique soit l'option la plus efficace chez les patients en stade terminal (Fallowfield and Iredale, 2004).

Il est maintenant clairement établi que la fibrose hépatique peut régresser. Ainsi, chez des patients atteints d'hépatite B ou C chronique, une régression de la fibrose et une diminution des quantités de collagène produites dans le foie a été observée dans la majorité des cas après traitement des hépatites présentant une réponse virologique complète (D'Ambrosio *et al.*, 2012; Marcellin *et al.*, 2013; Lee, Wallace and Friedman, 2015). De plus, la régression de la cirrhose a également été observée depuis, chez des patients souffrant de lésions hépatiques dues à la consommation excessive d'alcool, de cirrhose biliaire secondaire, de NASH, d'hémochromatose, d'obstruction biliaire et d'hépatite auto-immune (Ellis and Mann, 2012; Pellicoro *et al.*, 2014). Par ailleurs, la réversibilité des lésions de fibrose sévères est moindre chez les patients atteints de NASH, en l'absence de traitement spécifique (Tai *et al.*, 2012). Cependant, chez des patients obèses atteints de NASH et ayant bénéficié d'une chirurgie bariatrique, des effets prometteurs ont été observés. En effet, un an après chirurgie, on observe un début de résolution de la NASH jusqu'à sa résolution complète cinq ans après la chirurgie (Lassailly *et al.*, 2020). Expérimentalement, il a été démontré que lors de la régression de la fibrose hépatique, les myofibroblastes deviennent apoptotiques (Pellicoro *et al.*, 2014) ou sénescents (Krizhanovsky *et al.*, 2008). Des mécanismes de « désactivation » des myofibroblastes ont également été démontrés (Troeger *et al.*, 2012; Merkt *et al.*, 2021). La preuve du caractère réversible de la fibrose hépatique constitue donc une excellente base rationnelle pour la recherche de traitements à visée anti-fibrotique (Lee, Wallace and Friedman, 2015). En effet, près de mille essais cliniques visent actuellement à traiter la fibrose hépatique ou à développer des tests diagnostiques ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), témoignant de l'intérêt de cette thématique pour les laboratoires publics et privés (Lee, Wallace and Friedman, 2015).

### III. Les microARN

Les dernières avancées dans le domaine de la biologie moléculaire ont révolutionné notre conception du génome en montrant que l'expression des gènes n'est pas seulement régulée par des protéines mais également par la fraction non codante du génome (Panni *et al.*, 2020). Les ARN non codants (ARNnc) sont classés selon leur taille (Esteller, 2011). On distingue ainsi, en particulier, les petits ARNnc (< 50 nt), dont font partie les microARN (miARN) et les longs ARN non codants (lncARN > 200 nt) (Esteller, 2011) (**Figure 27**).

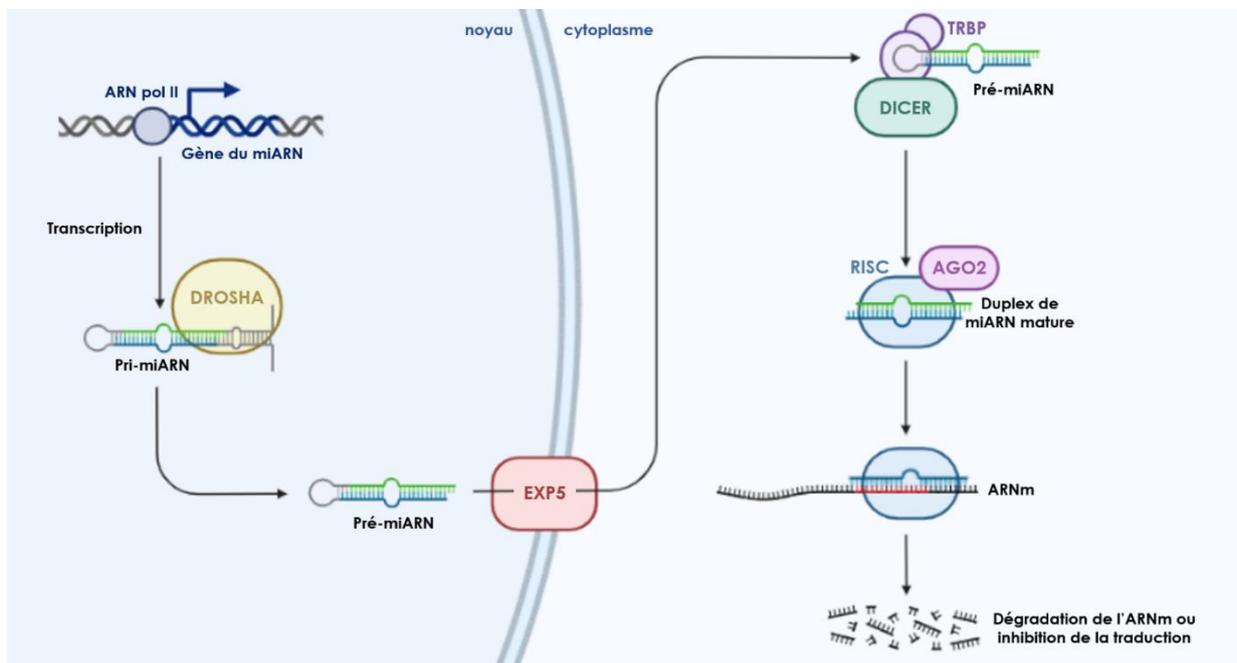
		Catégories d'ARN	Fonctions	
ARN	ARN codants	ARNm	Expression des protéines	
	ARN non codants (ARNnc)	ARN ribosomiaux (ARNr)	Synthèse de protéines	
		ARN de transfert (ARNt)	Synthèse de protéines	
		Long ARN non codants (lncARN)	Régulation de la chromatine Régulation post-transcriptionnelle Régulation de la transcription	
		Petits ARN non codants	microARN (miARN)	Régulation des ARNm
			Petits ARN interférents (siARN)	Inhibition post-transcriptionnelle
			Petits ARN nucléolaire (snoARN)	Modification chimique des ARN
			Petits ARN nucléaire (snARN)	Maturation des ARN
			ARN interagissant avec piwi (piARN)	Inhibition de l'activité des transposons pendant le développement embryonnaire

Figure 27 : Classification des ARN non codants (ARNnc). D'après Van der Hauwaert *et al.*, 2019.

Les microARN (miARN) sont des petits ARNnc d'une vingtaine de nucléotides qui régulent négativement l'expression des gènes (Lu and Rothenberg, 2018; Ghanbarian, Yildiz and Tutar, 2022). A ce jour, chez l'Homme, près de 2700 miARN matures (miRbase v22.1) ont été identifiés (Kozomara, Birgaoanu and Griffiths-Jones, 2019). Les miARNs, qui réguleraient la majorité des ARNm, sont impliqués dans la plupart des processus cellulaires (Lin *et al.*, 2019; H. Zhang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022) et leur dérégulation joue un rôle important dans de nombreuses pathologies comme le cancer (McManus, 2003; Li *et al.*, 2019), les maladies cardio-vasculaires (Ikeda *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2022) ou encore les maladies fibro-prolifératives (van Rooij *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2009; Pottier *et al.*, 2014; Savary *et al.*, 2019b).

## 1. Biogenèse

Les gènes de miARN sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II en un transcrite primaire de taille variable, nommé pri-miARN. Ce dernier est ensuite pris en charge par un complexe enzymatique constitué de l'endonucléase DROSHA et de la protéine DGCR8 (DiGeorge Critical Region 8), catalysant l'hydrolyse du pri-miARN en un pré-miARN d'environ 70 nucléotides. Le pré-miARN est alors exporté dans le cytoplasme grâce à un complexe exportine 5-Ran-GTP (EXP5). La maturation du pré-miARN se poursuit par un nouveau clivage réalisé par l'endonucléase DICER, à l'origine de la formation d'un duplex contenant les séquences du (ou des) miARN mature(s). Le duplex de miARN est enfin pris en charge par le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (Jonas and Izaurralde, 2015; Larrue *et al.*, 2022; Rani and Sengar, 2022) (**Figure 28**). Une fois chargé au sein du complexe RISC, le brin « guide » pourra exercer sa fonction de répression génique alors que le brin « passager » sera rapidement relargué dans le cytoplasme pour y être dégradé. Cependant, dans certains cas, les deux brins exercent une activité biologique. On distingue alors les deux miARN par les suffixes -3p et -5p selon leur brin d'origine (Ro *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2010).

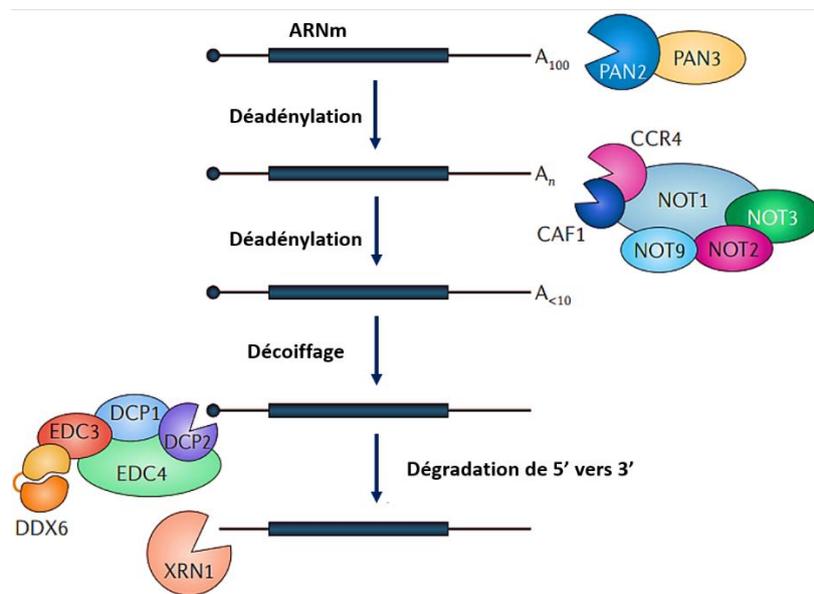


**Figure 28 : Biogenèse des miARN.** Le gène du miARN est transcrit dans le noyau par l'ARN polymérase II puis est ensuite clivé en pré-miARN. Ce dernier est exporté dans le cytoplasme par l'exportine-5 et clivé par DICER en un duplex de miARN matures. Le duplex est ensuite pris en charge par le complexe RISC. Le brin dit « passager » est dégradé tandis que le brin « guide » pourra exercer sa fonction de répression génique soit en dégradant l'ARNm cible soit en inhibant la traduction de l'ARNm. ARN pol II = ARN polymérase II ; EXP5 = Exportine-5 ; TRBP = Transactivation response element RNA-Binding Protein) ; AGO2 = Argonaute 2.

## 2. Mécanisme d'action

### a. Le complexe RISC

Le complexe RISC est composé, chez l'homme, de 4 protéines argonautes (Ago1 à Ago4). Parmi elles, seule Ago2 exerce la fonction d'endonucléase au niveau de l'ARNm cible si la complémentarité entre le miARN et sa cible est parfaite (Ameres and Zamore, 2013; Jonas and Izaurralde, 2015). Cependant, ce mécanisme est minoritaire chez les animaux (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Ainsi dans la majorité des cas, l'appariement entre le miARN et sa cible est imparfait, et les miARN exercent leur fonction de répression génique principalement par un mécanisme de déstabilisation des ARNm (Jonas and Izaurralde, 2015), impliquant la déadénylation de la queue poly-A de l'ARNm à son extrémité 3' par le complexe déadénylase CAF1-CCR4-NOT, puis l'ablation de la coiffe de l'ARNm par l'enzyme DCP2 (Decapping mRNA 2), et enfin la dégradation du transcrite cible par l'exoribonucléase 1 (XRN1) (Huntzinger and Izaurralde, 2011) (**Figure 29**).



**Figure 29 : Mécanisme de dégradation de l'ARNm.** La déadénylation de la queue poly-A de l'ARNm est initiée par le complexe PAN2-PAN3 et poursuivie par le complexe CAF1-CCR4-NOT. La déadénylation est suivie de l'ablation de la coiffe en 5' par l'enzyme DCP2 puis par la dégradation de l'ARNm par l'exoribonucléase XRN1. PAN2 et 3 = Poly-A Nuclease 2 et 3 ; DCP1 et 2 = Decapping Protein 1 et 2 ; EDC3 et 4 = Enhancer of Decapping 3 et 4 ; DDX6 = Dead Box protein 6 ; XRN1 = Exoribonuclease 1. D'après Jonas and Izaurralde, 2015.

### **b. Reconnaissance du gène cible**

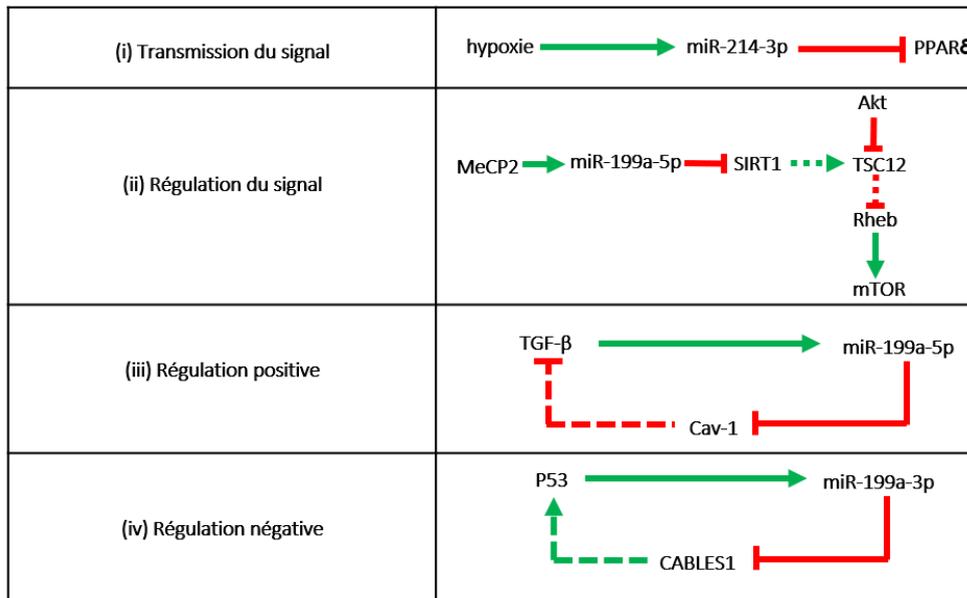
La reconnaissance de l'ARNm par le miARN est principalement conditionnée par la complémentarité entre une courte séquence (« seed ») du miARN, comprenant généralement les nucléotides 2 à 7 en 5' et la séquence « MRE » (miRNA Responsive Element) de l'ARNm, située généralement dans la région 3'-UTR (Untranslated Transcribed Region) de l'ARNm cible (Bartel, 2004, 2009; Agarwal *et al.*, 2015). Dans 25% des cas, la séquence MRE peut être située dans la séquence codante de l'ARNm (Chi *et al.*, 2009) et dans de rares cas, au niveau de sa région 5'-UTR (Ørom, Nielsen and Lund, 2008).

## **3. Fonctions biologiques**

De nombreuses études portant sur les miARN ont émergé ces vingt dernières années et ont permis de démontrer l'importance des miARN dans la régulation de gènes impliqués dans le développement et les processus biologiques (Triboulet *et al.*, 2007; Chaudhuri *et al.*, 2011; Li and He, 2012; Bhaskaran and Mohan, 2014; Ha and Kim, 2014; Bartel, 2018). Leur dérégulation est à l'origine de maladies comme le cancer (Dai *et al.*, 2019) et les maladies fibroprolifératives (Sun *et al.*, 2022). Ainsi, les miARN sont devenus des cibles thérapeutiques intéressantes et certains d'entre eux font d'ores et déjà l'objet d'études cliniques (van der Ree *et al.*, 2016).

### **a. Mécanismes d'action**

Le développement des connaissances actuelles a permis, en fonction du contexte cellulaire, de définir quatre modes d'action principaux des miARN qui sont illustrés ci-dessous en prenant l'exemple des miARN du cluster miR-199/214 (**Figure 30**).



**Figure 30 : Mécanismes d'action des miARN.** Quatre modes d'action principaux ont été identifiés. (i) transmission du signal. Le miARN fait partie de la voie de signalisation. Exemple de PPAR $\delta$  ; (ii) régulation du signal. Le miARN régule finement la voie de signalisation mTOR en inhibant SIRT1 ; (iii) Boucle de régulation positive. La dérégulation du miARN amplifie la réponse biologique. Exemple de l'amplification de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  par miR-199a-5p ; (iv) Boucle de régulation négative. L'activation de miR-199a-3p limite la voie de signalisation de p53 en inhibant CABLES1. D'après Fellah *et al.*, 2022.

### *i. La transmission du signal*

Dans ce cas, le miARN fait partie intégrante de la voie de signalisation, et son absence empêche la transmission du signal. A titre d'exemple, au niveau cardiaque, la régulation du métabolisme des acides gras, induite par l'hypoxie, nécessite l'induction de miR-214-3p et le ciblage de PPAR- $\delta$  par ce miARN (el Azzouzi *et al.*, 2013).

### *ii. La régulation du signal*

Bien que le miARN ne soit pas inclus dans une voie de signalisation, sa dérégulation affecte indirectement la réponse biologique. Par exemple, dans le Syndrome de Rett, une maladie liée au développement neuronal, MeCP2 induit l'expression de miR-199a-5p qui impacte indirectement la voie de signalisation mTOR en ciblant SIRT1 (Tsujiura *et al.*, 2015).

### iii. Les boucles de rétrocontrôle positif

Elles permettent d'amplifier le signal. A titre d'exemple, dans la fibrose pulmonaire, l'expression de miR-199a-5p est induite par le TGF- $\beta$ . De plus, miR-199a-5p cible CAV-1, un constituant des cavéoles responsable de la dégradation du récepteur au TGF- $\beta$ , amplifiant ainsi la voie du TGF- $\beta$  (Savary *et al.*, 2019b).

### iv. Les boucles de régulation négative

A l'inverse, elles permettent de limiter le signal. Par exemple, dans le contexte de l'insuffisance cardiaque, l'activation de miR-199a-3p par p53 induit l'inhibition de CABLES1, un régulateur positif de p53. miR-199a-3p limite ainsi le processus de mort cellulaire par apoptose (Liu *et al.*, 2017b).

## b. Rôle des miARN dans les maladies fibroprolifératives

Depuis que van Rooij *et al.*, (2007) ont mis en évidence l'implication de miR-208 dans la fibrose cardiaque, de nombreux miARN dénommés « fibromiR » ont été décrits (Patel and Nouredine, 2012; Pottier *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2015; Savary *et al.*, 2019a; Arrighi *et al.*, 2021) (Tableaux 8-9).

Tableau 8 : Exemples de miARN pro-fibrotiques.

miARN	Tissus	Cibles	Mécanismes	Références
miR-21	Foie	SMAD7	↑ Voie de signalisation du TGF- $\beta$ ↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes	Li <i>et al.</i> , 2021a
	Rein	PTEN	↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes	Zhao <i>et al.</i> , 2021a
	Coeur	SMAD7	↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes ↑ Prolifération et migration cellulaire	Yuan <i>et al.</i> , 2017
	Poumon	SMAD7	↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes	Liu <i>et al.</i> , 2010

<b>miR-199a-5p</b>	Poumon	CAV1	↑ Voie de signalisation du TGF- $\beta$ ↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes ↑ Prolifération et invasion cellulaire	Lino Cardenas <i>et al.</i> , 2013 ; Savary <i>et al.</i> , 2019a
	Foie	SOCS7	↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes	Ding <i>et al.</i> , 2021
<b>miR-122</b>	Péritoine	SMAD5	↑ Voie de signalisation du Wnt/ $\beta$ -caténine ↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes ↑ EMT	Liu <i>et al.</i> , 2022b
	Rein	FOXO3	↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Migration cellulaire ↑ Inflammation ↑ Stress oxydant	Liu <i>et al.</i> , 2022a
<b>miR-34a</b>	Foie	ACSL1	↑ progression de la fibrose	Li <i>et al.</i> , 2011
<b>miR-214-3p</b>	Muscles	FGFR1	↑ Différenciation des fibroblastes	Arrighi <i>et al.</i> , 2021
	Poumon	GSK-3 $\beta$	↑ Voie de signalisation du Wnt/ $\beta$ -caténine ↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes	Savary <i>et al.</i> , 2019a ; Savary <i>et al.</i> , 2019b
<b>miR-33a</b>	Foie	PPAR $\alpha$	↑ Voie de signalisation du TGF- $\beta$ ↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Différenciation des fibroblastes ↑ Prolifération cellulaire	Li <i>et al.</i> , 2014b
	Coeur	Smad2/3	↑ Voie de signalisation du TGF- $\beta$ ↑ Expression de gènes pro-fibrotiques ↑ Prolifération	Yu <i>et al.</i> , 2017

**Tableau 9 : Exemples de miARN anti-fibrotiques.**

miARN	Tissus	Cibles	Mécanismes	Références
<b>miR-17~92</b>	Poumon	DNMT1	↑ Méthylation	Dakhlallah <i>et al.</i> , 2013
			↓ Expression de gènes pro-fibrotiques	
<b>miR-24-3p</b>	Muscles squelettiques	SMAD2	↓ Voie de signalisation du TGF- $\beta$	Sun <i>et al.</i> , 2018
			↓ Expression de gènes pro-fibrotiques	
<b>miR-29</b>	Foie	Collagène	↓ Expression de gènes pro-fibrotiques ↓ Différenciation des fibroblastes	Roderburg <i>et al.</i> , 2011
	Rein	Collagène	↓ Expression du collagène	Wang <i>et al.</i> , 2012b
	Poumon	SMAD3	↓ Voie de signalisation du TGF- $\beta$ ↓ Expression de gènes pro-fibrotiques	Xiao <i>et al.</i> , 2012
<b>miR-122-5p</b>	Muscles squelettiques	TGFBR2	↓ Voie de signalisation du TGF- $\beta$ ↓ Expression de gènes pro-fibrotiques	Sun <i>et al.</i> , 2018
<b>miR-34a</b>	Rein	NOTCH1	↑ Apoptose ↓ Prolifération ↓ Expression de gènes pro-fibrotiques	Zhang and Yang, 2022
	Foie	SMAD4	↓ Voie de signalisation du TGF- $\beta$	Feili <i>et al.</i> , 2018

Ainsi, les « fibromiR » jouent un rôle essentiel dans les voies de signalisation à la fois pro-fibrotiques et anti-fibrotiques, et une dérégulation de leur expression affecte les réponses biologiques qui découlent de ces voies (Pottier *et al.*, 2014). A titre d'exemple, une faible expression de miR-29 est associée à la production excessive des composants de la MEC (Van Rooij *et al.*, 2008; Roderburg *et al.*, 2011; Chioccioli *et al.*, 2022). En effet, Van Rooij *et al.*, (2008) ont montré que l'activation de la voie du TGF- $\beta$  inhibe l'expression de miR-29. Cette inhibition est associée à la sur-expression de gènes pro-fibrotiques. De même, la sur-expression de certains miARN, comme par exemple miR-33a, miR-21 ou encore miR-199a-5p, est associée à la prolifération des fibroblastes, à la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et à la sur-expression de gènes pro-fibrotiques comme les collagènes de type I et de type III, en régulant positivement notamment la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et plus particulièrement en favorisant la phosphorylation de Smad2 et Smad3 (Lino Cardenas *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017; Savary *et al.*, 2019a; Li *et al.*, 2021a; Li and Han, 2014b). De même, miR-21, est l'un des microARN dont le rôle dans l'initiation et le développement de nombreuses maladies est le mieux documenté (Kumarswamy, Volkmann and Thum, 2011; Li, Wei and Wang, 2018; Lu, Xie and Sun, 2021; Wang *et al.*, 2022a). Son rôle pléiotropique dans les maladies rénales fait l'objet d'une revue générale (**Annexe 1 – page 216**).

**Annexe 1 :**

Larrue R\*, **Fellah S\***, Van der Hauwaert C, Hennino MF, Perrais M, Lionet A, Glowacki F, Pottier N, Cauffiez C.

**The versatile role of miR-21 in renal homeostasis and diseases.**

Cells. 2022 ; 11 : 3525.

\* contribution équivalente

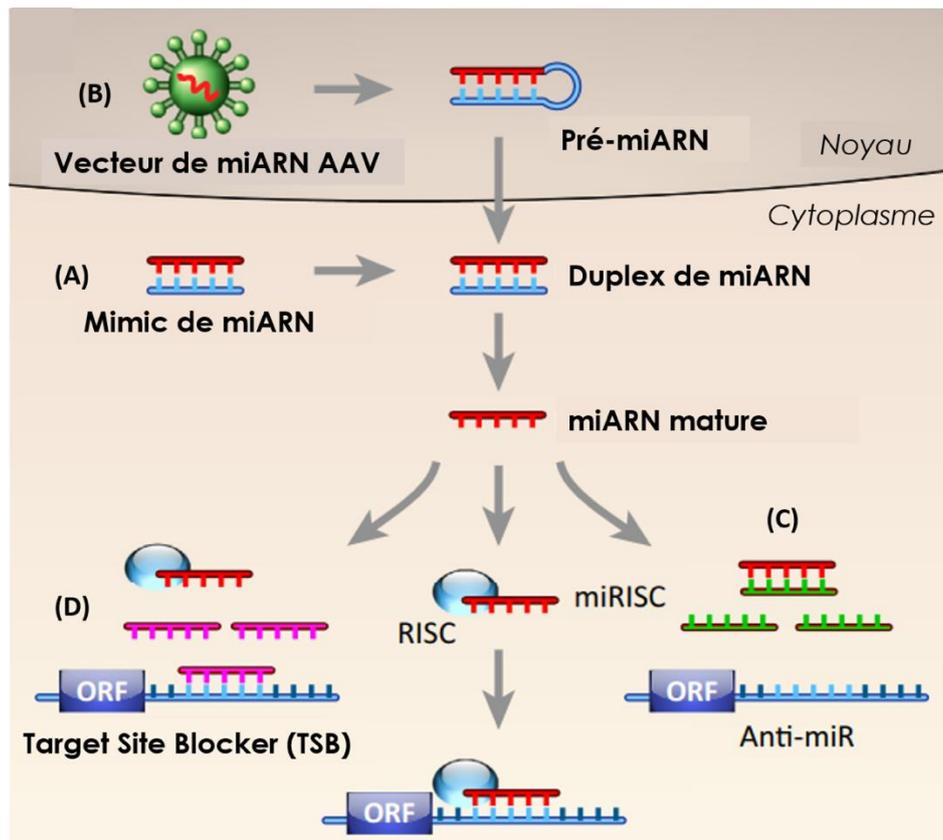
#### **4. Cibles thérapeutiques**

Les miARN sont des cibles thérapeutiques prometteuses en raison de leur rôle fondamental dans la régulation génique, leur petite taille et leur haut degré de conservation entre les espèces (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011). Ainsi, des approches thérapeutiques basées sur la restauration du niveau d'expression aberrante d'un miARN ont été développées et certaines d'entre elles sont d'ores et déjà en phase d'essai clinique (**Tableau 10**).

**Tableau 10 : Etudes cliniques et pré-cliniques en cours basées sur la régulation de l'expression des miARN.**

Industrie	miARN	Stratégie	Pathologie	Statut	Références
Santaris Pharma (Hoffmann-La Roche)	miR-122	Anti-miR	Hépatite C	Phase II	van der Ree <i>et al.</i> , 2016
Genzyme (Sanofi)	miR-21	Anti-miR	Syndrome d'Alport	Phase II	Chavez <i>et al.</i> , 2022
Regulus Therapeutics	miR-17	Anti-miR	Maladie rénale polykystique	Phase I	Lee <i>et al.</i> , 2019
MiRNA Therapeutics	miR-34a	mimic	Tumeurs solides	Phase I	Hong <i>et al.</i> , 2020
miRagen Therapeutics	miR-155	Anti-miR	Lymphomes cutanés	Phase II	Seto <i>et al.</i> , 2018
	miR-92a	Anti-miR	Ischémie	Phase I	Abplanalp <i>et al.</i> , 2020
	miR-29	mimic	Fibrose cutanée	Phase II	Gallant-Behm <i>et al.</i> , 2019

Les stratégies développées dépendent du type de dérégulation de l'expression du miARN dans le contexte pathologique. Il est possible soit de restaurer le niveau d'expression du miARN lorsque son expression est diminuée (Xiao *et al.*, 2007; van Rooij, Marshall and Olson, 2008), soit d'inhiber son expression lorsque celle-ci est augmentée (Krützfeldt *et al.*, 2005; van Rooij, Marshall and Olson, 2008) (**Figure 31**).



**Figure 31 : Stratégies proposées pour le ciblage des miARN.** (A-B) Stratégie de restauration de l'expression des miARN grâce à des mimics (précurseurs de miARN) ou des vecteurs d'adénovirus (AAV) ; (C-D) Stratégie d'inhibition de la fonction des miARN grâce à la séquestration du miARN par un anti-miR ou par compétitivité avec un Target Site Blocker (TSB). RISC = RNA-Induced Silencing Complex. D'après Pottier et al., 2014.

#### a. Restauration de la fonction du miARN

L'une des stratégies visant à restaurer le niveau d'expression d'un miARN consiste à introduire un oligonucléotide de synthèse, double brin, similaire au miARN mature endogène. Ce duplex (ou « mimic ») est constitué d'un brin correspondant au brin « guide » du miARN d'intérêt, et d'un brin dit « passager », complémentaire (ou partiellement complémentaire) (van Rooij, Marshall and Olson, 2008). La structure sous forme de duplex est nécessaire pour son chargement au sein du complexe RISC (Martinez *et al.*, 2002) (**Figure 31.A**).

Des modifications de bases des oligonucléotides de synthèse, comme l'introduction de bases 2'-fluoro (2'-F) sont réalisées afin d'améliorer leur stabilité vis-à-vis des exonucléases, (Chiu and Rana, 2003). De plus, des modifications des bases du brin passager, telle que la modification 5'-O-méthyl (5'-OMe), peuvent être apportées afin de favoriser sa dégradation et de réduire les effets « off-target » (Chiu and Rana, 2003; Jackson *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008). L'inconvénient majeur de cette option réside dans la restauration de l'expression du

miARN d'intérêt à un niveau supra-physiologique. L'utilisation de vecteurs viraux de type AAV (Adeno-Associated-Virus) permet de pallier à cette limite (**Figure 31.B**) et permet de restaurer l'expression des miARN à des niveaux physiologiques sans présenter de toxicité et sans être intégré au génome (Adriaansen, Vervoordeldonk and Tak, 2006; Aalbers, Tak and Vervoordeldonk, 2011; van Rooij and Kauppinen, 2014). De manière intéressante, un certain nombre d'AAV modifiés ont été développés afin de cibler des tissus et types cellulaires spécifiques (Michelfelder and Trepel, 2009), notamment des mosaïques de vecteurs associant plusieurs sérotypes de AAV ou encore des virions chimériques contenant des protéines de capsides (Wu, Asokan and Samulski, 2006).

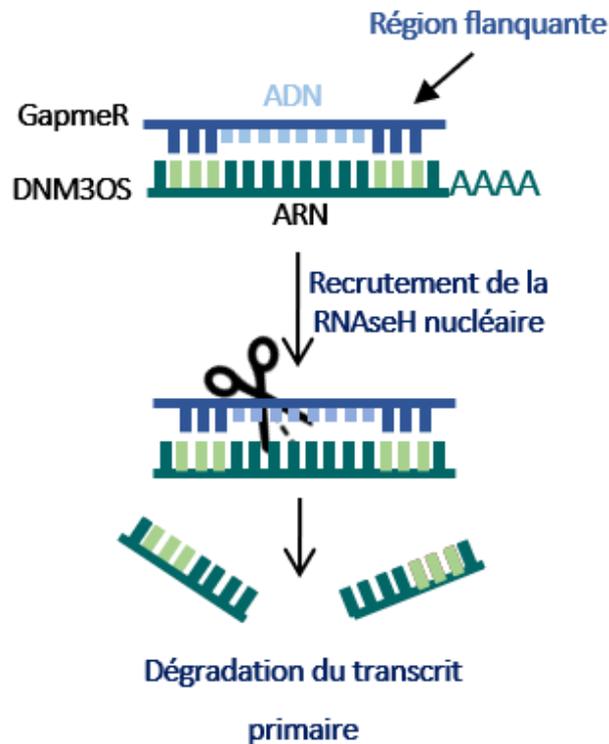
## **b. Inhibition de la fonction du miARN**

### *i. Inhibition des miARN*

La stratégie d'inhibition la plus courante est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens (ASO) de type antagomiR (« anti-miR ») et fait actuellement l'objet de plusieurs essais cliniques chez l'Homme, notamment le Miravisen dirigé contre miR-122 dans le cadre de l'hépatite C (van der Ree *et al.*, 2016) ou encore le Lademirsén dirigé contre miR-21 pour le traitement du syndrome d'Alport (Gomez *et al.*, 2015; Chavez *et al.*, 2022) (**Tableau 10**). Les anti-miR sont des séquences d'ARN, complémentaires du miARN mature, capables de séquestrer le miARN au sein du complexe RISC, et par conséquent d'empêcher l'interaction du miARN sur sa cible (Obad *et al.*, 2011; Stenvang *et al.*, 2012; Pottier *et al.*, 2014; van Rooij and Kauppinen, 2014; Bennett, 2019) (**Figure 31-C**).

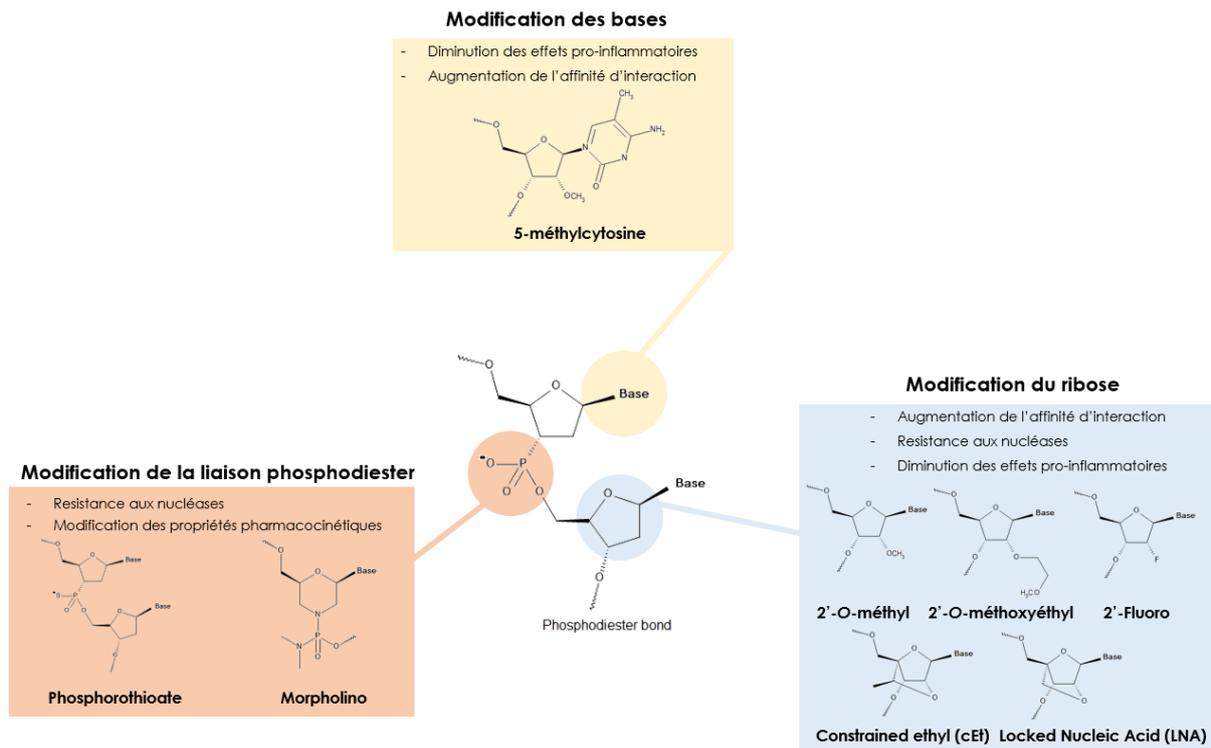
Par ailleurs, certains miARN, organisés en cluster, participent à la régulation de voies de signalisation en exerçant leur action de manière synergique (Chhabra, Dubey and Saini, 2010). Dans ce contexte, il apparaît intéressant de pouvoir cibler leur transcrite primaire, polycistronique, afin de pouvoir inhiber tous les miARN du cluster à l'aide d'une seule molécule (Morelli *et al.*, 2018; Savary *et al.*, 2019a). Ainsi, il est possible d'utiliser des molécules de type gapmer qui sont constituées d'une séquences d'ADN (« gap ») entourée de nucléotides modifiés (Asami *et al.*, 2021). La formation d'un duplex ADN / ARN permet le recrutement de la RNase H nucléaire induisant ainsi la dégradation du transcrite primaire (Bennett, 2019; Winkle *et al.*, 2021) (**Figure 32**). Cette stratégie a déjà montré des effets

bénéfiques dans le cadre du myélome multiple en ciblant le long ARN non codant MIR17HG (miR-17~92), transcrit primaire de six miARN matures (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1) (Morelli *et al.*, 2018).



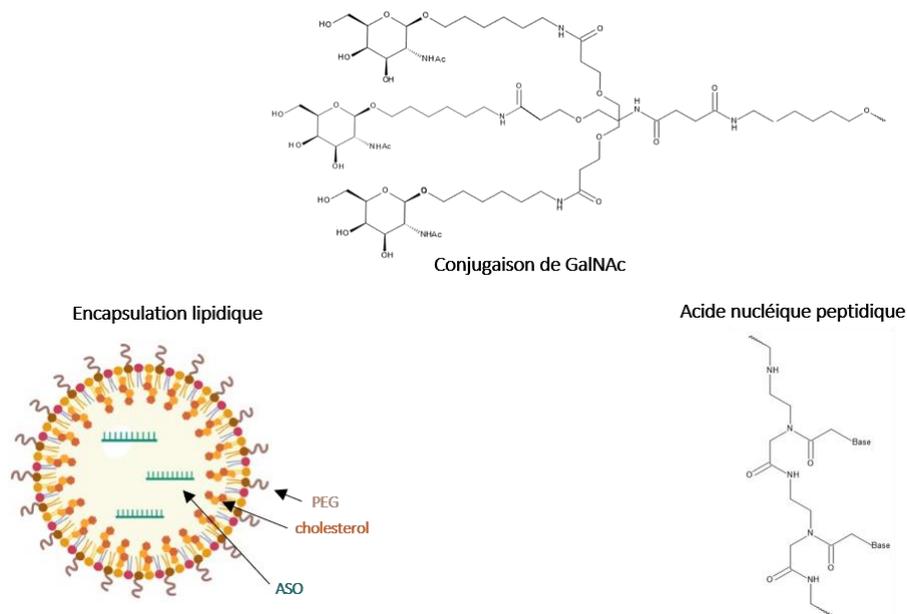
**Figure 32 : Mécanisme d'action des GapmeR.** La formation d'un duplex ADN/ARN induit le recrutement de la RNase H nucléaire et permet la dégradation du transcrit primaire dans le noyau. D'après Fella et al., 2022.

L'introduction de modifications chimiques sur les nucléotides constitutifs des ASO permet d'améliorer leurs paramètres pharmacocinétiques, leur stabilité (résistance aux nucléases) ou encore leur affinité pour leur(s) cible(s) (Bennett *et al.*, 2017; Bennett, 2019). Parmi les différentes modifications, les plus courantes correspondent à l'ajout en position 2' du ribose de groupements de type 2'-O-méthyl ou 2'-Fluoro, ou à la formation d'un pont intra-caténaire entre le 2' et le 4' du ribose (Locked Nucleic Acid, LNA). En particulier, les modifications de type LNA permettent d'augmenter l'affinité de l'ASO pour sa cible (Obad *et al.*, 2011; Bernardo *et al.*, 2012) (Figure 33).



**Figure 33 : Exemples de modifications chimiques des oligonucléotides.** Afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques des ASO, des modifications chimiques peuvent être faites au niveau des bases ou des riboses constitutifs des nucléotides ou encore au niveau des liaisons phosphodiester. D'après Fella et al., 2022.

Par ailleurs, l'encapsulation permet d'améliorer la distribution des ASO. Enfin, la conjugaison de l'ASO à des molécules biologiques (comme le cholestérol, des sucres, des acides gras ou des acides nucléiques peptidiques) permet d'améliorer le ciblage dans certains organes (Biscans *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2021; Fella *et al.*, 2022) (**Figure 34**).



**Figure 34 : Exemples de stratégies visant à améliorer la distribution des ASO.** Différentes technologies ont été développées afin d'améliorer la distribution des ASO ou de cibler des organes en particulier. Exemple de l'encapsulation lipidique et de la conjugaison de N-Acétyl Galactosamine (GalNAc) et d'un acide nucléique peptidique. D'après Fellah *et al.*, 2022.

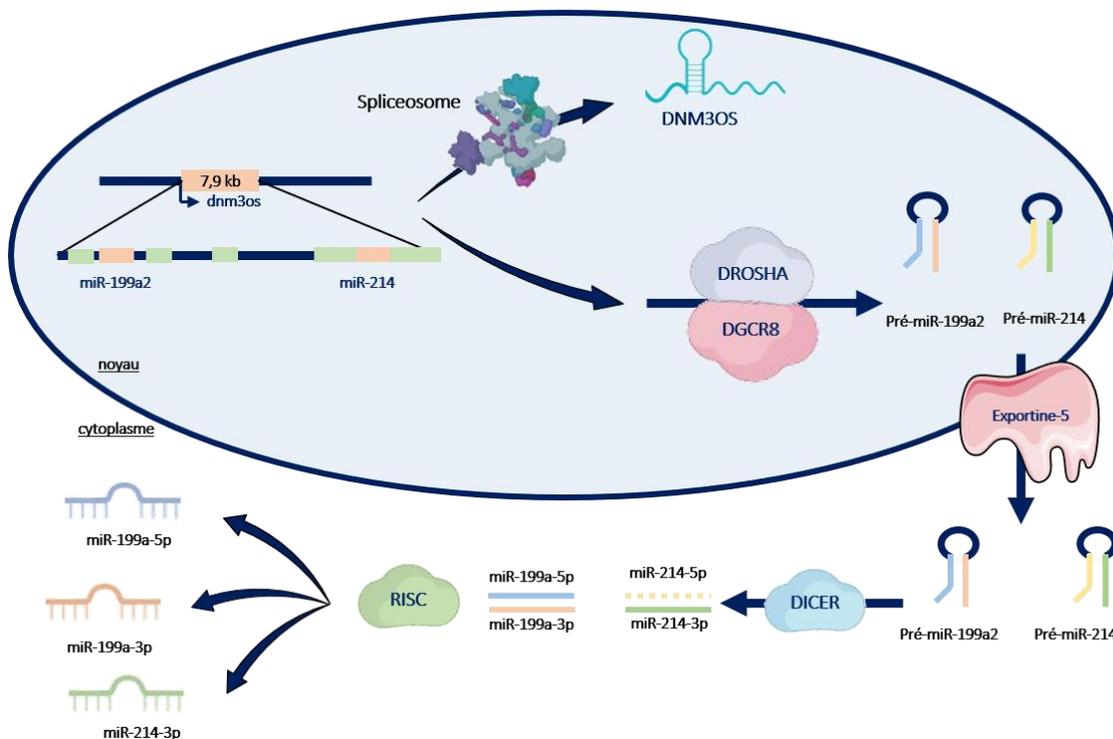
## ii. Inhibition de l'interaction d'un miARN avec sa cible

Cette stratégie, basée sur l'utilisation de TSB (Target Site Blocker) consiste à bloquer spécifiquement l'interaction d'un miARN avec sa cible. Les TSB sont des oligonucléotides dont la séquence est complémentaire de la région MRE de l'ARNm cible (Knauss, Bian and Sun, 2013). De ce fait, le miARN ne peut plus dégrader l'ARNm cible, rétablissant ainsi son niveau d'expression physiologique (Knauss, Bian and Sun, 2013) (**Figure 31.D**). L'avantage de cette stratégie est de ne pas moduler les autres cibles du miARN, ce qui permet de réduire les potentiels effets secondaires associés à l'inhibition de l'ensemble de ses cibles (Knauss, Bian and Sun, 2013).

## B. Travaux personnels : Rôle du long ARN non codant

### DNM3OS dans la fibrose hépatique

DNM3OS (Dynamain 3 Opposite Strand) est un lncARN anti-sens de 4,1 kb situé dans le 14<sup>ème</sup> intron du gène humain de la dynamine 3 (DNM3). De manière intéressante, DNM3OS contient deux locus très conservés, *miR-199a2* et *miR-214*, conduisant, une fois transcrits, à la biosynthèse de trois miARN matures *miR-199a-5p*, *miR-199a-3p* et *miR-214-3p* (Desvignes, Contreras and Postlethwait, 2014) (Figure 35).



**Figure 35 : Biogenèse de *miR-199a-5p*, *miR-199a-3p* et *miR-214-3p* à partir du transcrite primaire DNM3OS (Dynamain 3 Opposite Strand).** Une fois transcrit par l'ARN polymérase II, le transcrite primaire *dnm3os* est soit pris en charge par le spliceosome pour donner un lncARN mature DNM3OS, soit clivé par le complexe DROSHA/DGCR8 en deux pré-miARN : pré-miR-199a2 et pré-miR-214. Les pré-miARN sont exportés par l'exportine-5 dans le cytoplasme puis pris en charge et clivés par DICER pour produire des duplex de miARN. Les miARN matures *miR-199a-5p*, *miR-199a-3p* et *miR-214-3p* sont pris en charge par le complexe RISC afin d'exercer leur fonction de régulation de l'expression des gènes tandis que *miR-214-5p* est dégradé. D'après Fellah et al., 2022.

L'expression de DNM3OS varie selon les tissus et les types cellulaires. De plus, la dérégulation de son expression ou de l'un des trois miARN du cluster, entraîne des conséquences pathologiques. Le rôle pléiotropique de DNM3OS est détaillé dans le cadre d'une revue générale (**Annexe 2 – page 217**).

**Annexe 2 :**

**Fellah S\***, Larrue R\*, Truchi M, Vassaux G, Mari B, Cauffiez C, Pottier N.

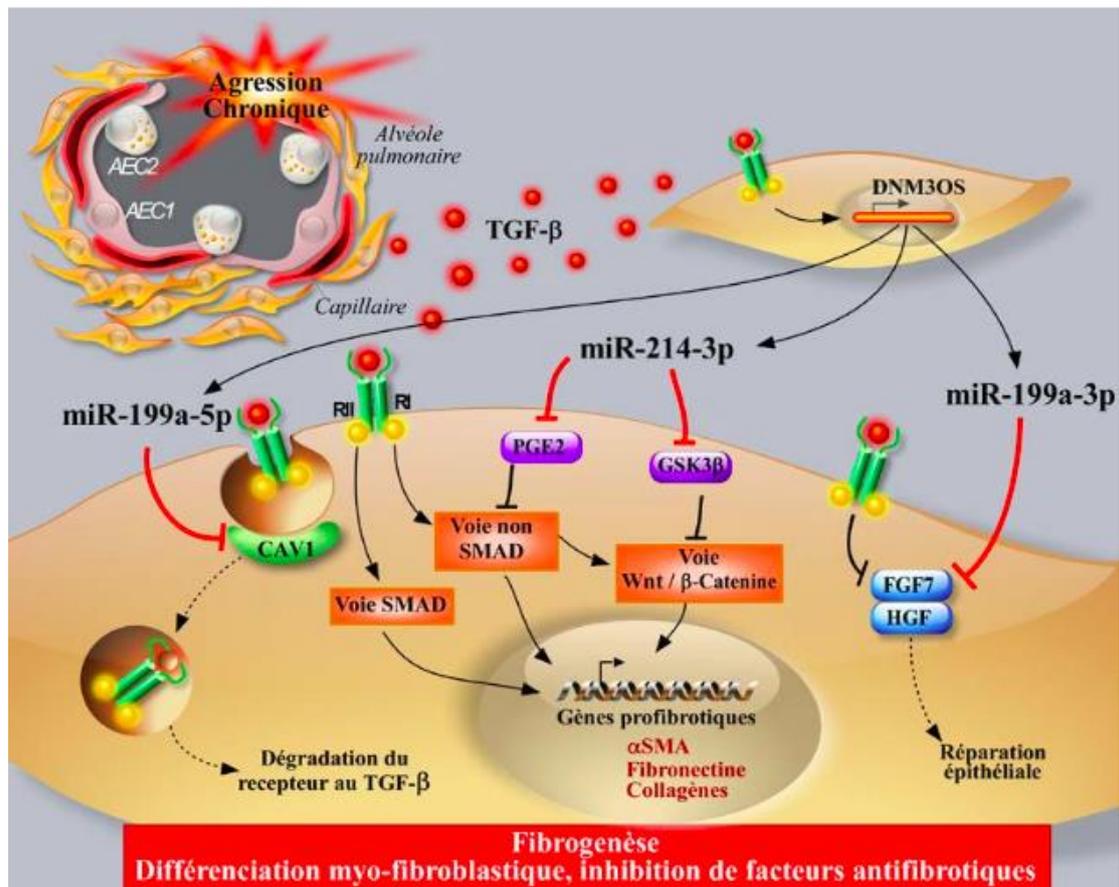
**Pervasive roles of the long non coding RNA DNM3OS in development and diseases.** *WIRE's RNA*. 2022 ; e17.

\* Contribution équivalente

Les travaux portant sur le rôle de DNM3OS dans la fibrose hépatique font suite à l'étude de Savary et al., (2019) concernant l'implication de ce long ARN non codant, et des trois miARN dont il est le précurseur, dans la fibrose pulmonaire idiopathique. En effet, l'expression de DNM3OS, miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p est augmentée dans les fibroblastes pulmonaires traités au TGF- $\beta$  et dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par instillation intra-trachéale de bléomycine. De plus, DNM3OS est exprimé de manière spécifique dans les fibroblastes activés. En effet, l'exploitation d'une étude récente de transcriptomique (séquençage des ARN sur cellules uniques) sur la biopsie d'un patient atteint de fibrose pulmonaire idiopathique a permis de mettre en évidence que, parmi l'ensemble des sous-populations cellulaires présentes, seuls les fibroblastes expriment DNM3OS.

Savary et al., (2019) ont également démontré que les trois miARN, miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p, jouent un rôle synergique dans l'amplification de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et dans le processus de fibrogenèse. Ainsi, miR-199a-5p régule l'expression du gène codant pour la cavéoline-1 (CAV1), une protéine anti-fibrotique membranaire essentielle à la formation des cavéoles et impliquée dans l'internalisation et la dégradation du complexe formé par le TGF- $\beta$  et ses récepteurs. MiR-214-3p intervient, quant à lui, dans la voie non-canonique du TGF- $\beta$  en régulant notamment la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Enfin, en ciblant deux facteurs de croissances essentiels à la cicatrisation, HGF (Hepatocyte Growth Factor) et FGF7

(Fibroblast Growth Factor 7), miR-199a-3p module la réparation épithéliale. Au total, ces trois miARN agissent collectivement pour amplifier des mécanismes moléculaires centraux du processus de fibrogenèse (**Figure 36**).



**Figure 36 : Effet pro-fibrotique de DNM3OS dans le processus de fibrose pulmonaire.** Le TGF- $\beta$  induit la transcription du gène du long ARN non codant DNM3OS, précurseur de trois miARN matures miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p. Ces miARN jouent un rôle dans la régulation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ . En particulier miR-199a-5p est impliqué dans la voie canonique du TGF- $\beta$  en ciblant la cavéoline 1 (CAV1), un constituant des cavéoles, responsables de la dégradation des récepteurs au TGF- $\beta$ . MiR-214-3p joue un rôle dans la voie de signalisation non canonique *via* la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en ciblant GSK-3. Par ailleurs, miR-199a-3p est impliqué dans la réparation épithéliale en ciblant FGF7 et HGF. AEC1 et AEC2 = Alveolar Epithelium Cells type I et type 2 ; CAV1 = Cavéoline-1 ; ECM = Matrice Extracellulaire ; FGF7 = Fibroblast Growth Factor 7 ; GSK3 $\beta$  = Glycogen Synthese Kinase 3 $\beta$  ; HGF = Hepatocyte Growth Factor ; PGE2 = Prostaglandine E2 ; RI et RII = Récepteur au TGF de type I et type II. D'après Savary *et al.*, 2019.

Enfin, trois stratégies d'inhibition (ciblage de DNM3OS, miR-199a-5p et protection de la cible CAV1 grâce à un TSB) ont été évaluées dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par instillation intra-trachéale de bléomycine. L'inhibition de DNM3OS, et par conséquent des trois miARN du cluster (miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p), par un ASO de type

GapmeR est associée à une diminution de l'accumulation des composants de la MEC (collagène de type I et fibronectine), limitant ainsi le développement des lésions de fibrose. De même, le ciblage de miR-199a-5p, à l'aide d'un oligonucléotide complémentaire et le masquage de CAV1 par un TSB, présente également un effet anti-fibrotique (Savary *et al.*, 2019a).

Les mécanismes de fibrose étant similaires dans tous les organes (Weiskirchen, Weiskirchen and Tacke, 2019), nous avons souhaité étendre l'étude de DNM3OS au contexte de la fibrose hépatique qui représente un problème de santé publique majeur (Marcellin and Kutala, 2018). Les objectifs de cette étude ont ainsi été (i) de déterminer le rôle pro-fibrotique de DNM3OS dans la fibrose hépatique, (ii) d'évaluer les effets de l'inhibition de DNM3OS, à l'aide d'un ASO de type GapmeR, sur le développement et la sévérité des lésions de fibrose dans un modèle pré-clinique par administration répétée de CCl<sub>4</sub>, (iii) de déterminer le rôle de chacun des miARN dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et dans le processus de fibrogenèse grâce à des études de perte et de gain de fonction dans une lignée immortalisée humaine de cellules stellaires (HSC).

## C. Matériel et Méthodes

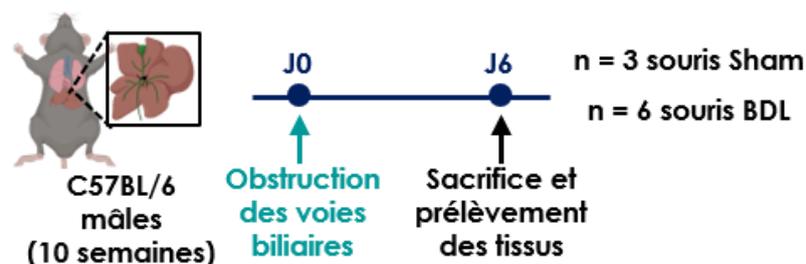
### I. Modèles animaux

Tous les protocoles de soins et d'expérimentation animale ont été approuvés par le comité d'éthique en expérimentation animale (CEEA) de l'Université de Lille (numéro de protocole : 2017110612102233).

#### 1. Modèles murins de fibrose hépatique

##### a. Modèle par obstruction des voies biliaires (BDL)

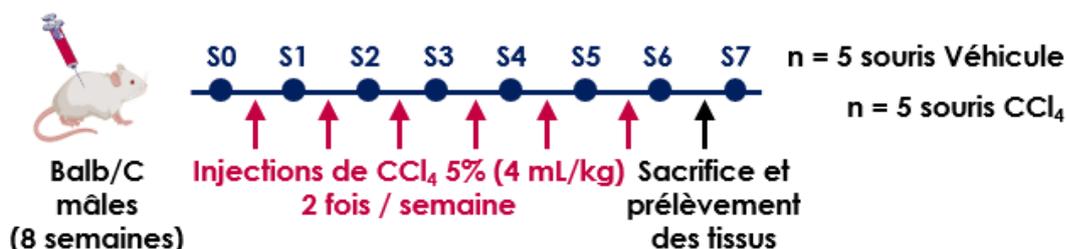
Des souris mâles de type C57BL/6 âgées de 10 semaines (n=6) ont subi une obstruction des voies biliaires (« BDL »). D'autres souris (n=3) ont reçu une laparotomie sans obstruction (« sham »). Les souris sont sacrifiées 6 jours après la chirurgie (**Figure 37**). Les foies sont alors prélevés et découpés en trois parties. Une partie est immergée dans du formol (VWR Chemicals) puis inclus en paraffine pour les études histologiques. Une autre part est congelée à sec dans de l'azote liquide puis conservée à -80 °C pour l'analyse protéique. La dernière partie du foie est plongée dans du RNAlater (ThermoFisher), solution de conservation des ARN, pendant 24 h puis conservée à -80 °C.



**Figure 37 : Protocole expérimental du modèle de fibrose hépatique par obstruction des voies biliaires.** Des souris mâles de type C57BL/6 âgées de 10 semaines (n=6) ont subi une obstruction des voies biliaires six jours avant leur sacrifice et le prélèvement des tissus. Trois souris « contrôle » ont subi une laparotomie sans obstruction. BDL = Obstruction des voies biliaires.

### b. Modèle par administration de tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>)

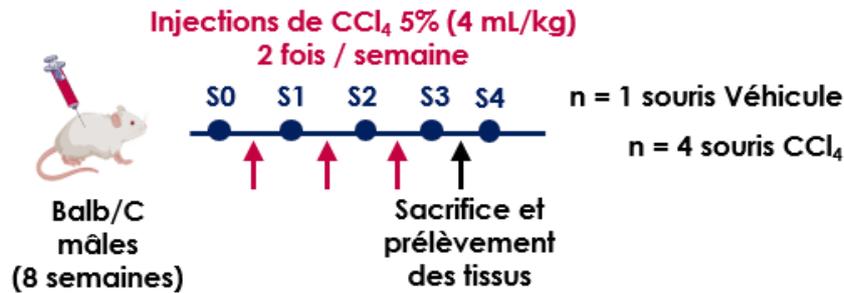
Les souris de type Balb/C âgées de 8 semaines (n=5) ont reçu deux injections intrapéritonéales (i.p) par semaine pendant 6 semaines de CCl<sub>4</sub> (Sigma) dilué à 5% dans de l'huile de maïs (Sigma) à une dose de 4 mL/kg. D'autres souris (n=5) ont reçu uniquement de l'huile de maïs, comme contrôle (**Figure 38**).



**Figure 38 : Modèle de fibrose hépatique par injections intrapéritonéales de CCl<sub>4</sub>.** Des souris Balb/C mâles âgées de 8 semaines ont reçu des injections intrapéritonéales de CCl<sub>4</sub> (dilué à 5% dans de l'huile de maïs) à 4 mL/kg (n=5) deux fois par semaine pendant six semaines. D'autres souris ont reçu des injections d'huile de maïs (n=5). CCl<sub>4</sub> = tétrachlorométhane.

Au moment du sacrifice, les foies sont prélevés et découpés en trois parties. Une partie est plongée dans du formol (VWR Chemicals) pour les études histologiques. Une autre part est congelée à sec dans de l'azote liquide puis conservée à -80 °C pour l'analyse protéique. La dernière partie du foie est plongée dans du RNAlater (ThermoFisher), solution de conservation des ARN, pendant 24 h puis conservé à -80 °C.

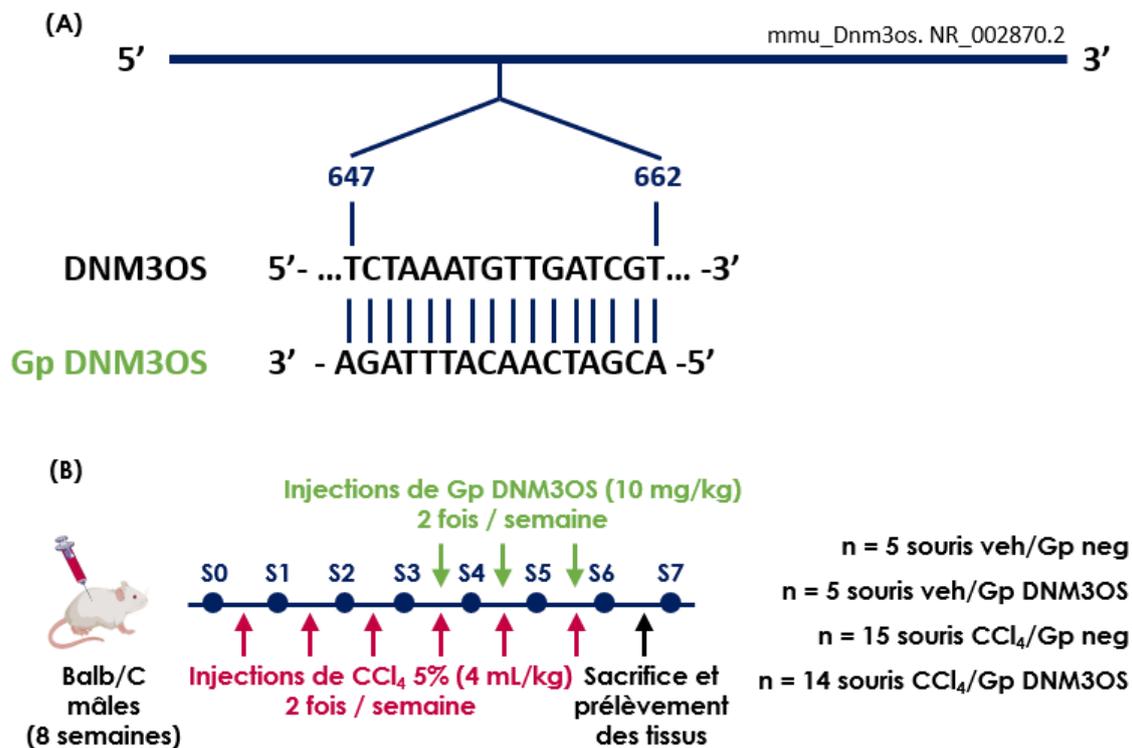
De plus, afin de confirmer que trois semaines d'exposition au CCl<sub>4</sub> sont suffisantes pour induire des lésions de fibrose, un protocole similaire mais de durée plus courte a été mis en place sur un petit nombre d'animaux (**Figure 39**).



**Figure 39 : Modèle de fibrose hépatique par injections intrapéritonéales de CCl<sub>4</sub>.** Des souris Balb/C mâles âgées de 8 semaines ont reçu des injections intrapéritonéales de CCl<sub>4</sub> (dilué à 5% dans de l'huile de maïs) à 4 mL/kg (n=4) deux fois par semaine pendant trois semaines. Une souris a reçu des injections d'huile de maïs (n=1). CCl<sub>4</sub> = tétrachlorométhane.

**c. Administration d'un oligonucléotide anti-sens de type GapmeR dirigé contre DNM3OS dans le modèle CCl<sub>4</sub>**

L'évaluation de l'efficacité de l'administration curative d'un oligonucléotide anti-sens de type GapmeR dirigé contre DNM3OS (Qiagen), dont la séquence est présentée **Figure 40.A**, est réalisée dans le modèle chimique par administration de CCl<sub>4</sub>. Quatre groupes de souris mâles de type Balb/C âgées de 8 semaines sont constitués et sont présentés **Figure 40.B**. Au sacrifice, les foies sont prélevés et découpés en trois parts. Une partie est plongée dans du formol (VWR Chemicals) pour les études histologiques. Un échantillon est plongé dans l'azote puis conservé à -80 °C pour l'analyse protéique. Le dernier échantillon est plongé dans du RNAlater (ThermoFisher), pendant 24 h puis conservé à -80 °C.



**Figure 40 : Protocole expérimental de l'administration curative d'un oligonucléotide antisens de type GapmeR dirigé contre DNM3OS dans le modèle de fibrose hépatique induite par administration de CCl<sub>4</sub>.** (A) Séquence du GapmeR dirigé contre *Dnm3os* (séquence de référence NR\_002870.2) (B) Des souris Balb/C mâles âgées de 8 semaines ont reçu des injections intrapéritonéales de CCl<sub>4</sub> (dilué à 5% dans de l'huile de maïs) à 4 mL/kg (n=15), deux fois par semaine pendant six semaines. D'autres souris ont reçu des injections d'huile de maïs (n=5). Une fois les lésions de fibrose installées, après trois semaines d'administration de CCl<sub>4</sub>, les souris ont reçu des injections de GapmeR dirigé contre DNM3OS à la dose de 10 mg/kg. CCl<sub>4</sub> = tétrachlorométhane ; Veh = véhicule ; Gp = GapmeR

## 2. Extraction des ARN totaux (ARNt) tissulaires

Un échantillon de foie est placé dans un tube M GentleMACS® (Miltenyi Biotec) contenant 5 mL de Trizol (ThermoFisher) afin de lyser le tissu. La dissociation est réalisée grâce au programme RNA 02.01 du dissociateur GentleMACS™ (Miltenyi Biotec). Le broyat obtenu est transféré dans un tube conique de 15 mL (Falcon) auquel on ajoute 1 mL de chloroforme (VWR Chemicals). Le mélange est agité vigoureusement pendant 15 s puis centrifugé pendant 45 min à 3000 g et à 4 °C afin de séparer les ARN des protéines et de l'ADN. La phase aqueuse, qui contient les ARN, est transférée dans un tube propre. De l'isopropanol (VWR Chemicals) est ajouté (v/v) à la phase aqueuse pour précipiter les ARN, puis les échantillons sont incubés pendant 10 min à température ambiante. Après incubation, les échantillons sont centrifugés pendant 45 min à 3 000 g et à 4 °C. Les culots obtenus sont lavés par ajout de 5 mL d'éthanol 75% (v/v) (VWR Chemicals). Après centrifugation à 3 000 g et à 4 °C pendant 15 min, un

deuxième lavage à l'éthanol 75% est réalisé. Une fois l'élimination de l'éthanol effectuée, les tubes sont laissés à l'air libre pendant 30 min à température ambiante afin de sécher les culots qui seront alors repris dans de l'eau « RNase free » (ThermoFisher). La concentration en ARNt est dosée à l'aide du spectrophotomètre micro-volume Nanodrop (ThermoFisher).

### **3. Extraction des protéines**

L'extraction est réalisée sur 50 mg de broyat de foie. Le broyat est lysé dans 1 mL de tampon RIPA (RadiolImmunoPrecipitation Assay buffer, ThermoFisher) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche) pendant 24 h à 4 °C sur un agitateur rotatif. Le lysat est ensuite « soniqué » pendant 1 min puis centrifugé pendant 20 min à 15 000 g et à 4 °C afin de récupérer les protéines présentes dans le surnageant.

### **4. Histologie**

Des coupes histologiques de 5 µM de foie inclus en paraffine (FFPE - Formalin-Fixed Paraffin Embedded) sont déparaffinées et réhydratées dans des bains successifs de xylène (VWR Chemicals) et d'éthanol (VWR Chemicals) de concentrations décroissantes puis dans de l'eau de qualité milliQ. Chaque bain est réalisé deux fois pendant 5 min.

#### **a. Immunohistochimie**

Après réhydratation des coupes, la récupération des épitopes par protéolyse est réalisée à l'aide du tampon citrate Target Retrieval (DAKO) dans un four à micro-ondes pendant 20 min à 700 W. Une fois refroidies, les coupes sont incubées pendant 15 min dans du peroxyde d'hydrogène 3% (Sigma) afin de bloquer les peroxidases, puis incubées successivement pendant 10 min dans des solutions d'avidine (Vector) et de biotine (Vector), permettant l'amplification du signal. Les coupes sont ensuite incubées pendant 1 h à température ambiante avec du sérum de chèvre 5% (Sigma) afin de saturer les sites de fixation non-spécifiques, avant d'être incubées pendant 2 h à température ambiante avec des anticorps primaires de lapin dirigés contre l' $\alpha$ -SMA (Abcam ab5694, 1/100<sup>ème</sup>) et la fibronectine (Abcam ab2413, 1/200<sup>ème</sup>) puis pendant 30 min avec un anticorps secondaire chèvre anti-lapin biotinylé au 1/200<sup>ème</sup> (Vector).

La coloration est développée à l'aide du chromogène DAB (3,3 diaminobenzidine, Sigma) puis une contre-coloration des cellules à l'hématoxyline-éosine (Sigma) est réalisée. Enfin, les lames sont déshydratées dans des bains croissants d'éthanol et de xylène. Les lames sont montées à l'aide du milieu de montage Eukitt® (Fluka) et les clichés sont réalisés sur l'Axio Scan Z1 (Zeiss) à un grossissement x20.

#### **b. Coloration histologique au rouge sirius**

Les lames sont plongées dans une solution de rouge sirius (Scytek) pendant 1 h. Elles sont ensuite plongées rapidement dans un bain d'eau puis dans deux bains successifs d'acide acétique 0,5% (VWR Chemicals) afin d'éliminer l'excès de rouge sirius. Les coupes sont ensuite déshydratées par des bains de concentration croissante d'éthanol puis de xylène. Elles sont ensuite montées à l'Eukitt (Fluka) et les clichés en lumière blanche sont pris sur l'Axio Scan Z1 (Zeiss) à un grossissement x20.

## **II. Modèle cellulaire**

### **1. Entretien des cellules**

La lignée cellulaire LX-2 (Millipore) est une culture primaire humaine de cellules hépatiques stellaires (HSC) immortalisées par SV40 (Simian Virus 40). Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g/L de D-Glucose, ThermoFisher) supplémenté en Sérum de Veau Fœtal (2%) (ThermoFisher), Pénicilline/Streptomycine (1%) (ThermoFisher) et L-Glutamine (1%) (ThermoFisher). Les cellules sont cultivées dans une étuve à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2. Stimulation au TGF-β**

Afin d'induire un phénotype fibrotique, les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits (150 000 cellules/puits) puis stimulées pendant 24 h à des concentrations croissantes de TGF-β (Peprotech).

### 3. Transfection

Les cellules LX-2 sontensemencées dans une plaque 6 puits (150 000 cellules/puits) puis sont transfectées 24 h après ensemencement. La transfection est réalisée à l'aide de Lipofectamine RNAiMax™ (ThermoFisher), selon les recommandations du fournisseur, avec les précurseurs de miARN (mimics) prémiR-199a-5p (Assay ID : PM10893) et prémiR-199a-3p (Assay ID : PM11779) à une concentration finale de 10 nM (ThermoFisher), les oligonucléotides anti-sens de type LNA (Locked Nucleic Acid) LNA 199a-5p, LNA 199a-3p et LNA 214-3p à une concentration finale de 10 nM (Qiagen) ou un oligonucléotide anti-sens de type GapmeR (Gp) dirigé contre DNM3OS à une concentration finale de 25 nM (Qiagen). Des oligonucléotides contrôles ont également été transfectés. 48 h après transfection, les cellules sont ensuite stimulées au TGF- $\beta$  pendant 24 h à une concentration finale de 10 ng/mL (Peprotech). Les séquences des oligonucléotides anti-sens sont décrites dans le **Tableau 11**.

**Tableau 11 : Séquences des oligonucléotides antisens transfectés dans la lignée LX-2.**

Oligonucléotides	Séquences
LNA neg	5'-TCAGTATTAGCAGCT-3'
LNA 199a-5p	5'-TAGTCTGAACACTGG-3'
LNA 199a-3p	5'-GTCATCAGACGTGTAACCAA-3'
LNA 214-3p	5'-GTCGTCCGTGTCTGTCCGT-3'
Gp neg	5'-AACACGTCTATACGC-3'
Gp DNM3OS	5'-TTCTTAAGTGTCTGGA-3'

LNA = Locked Nucleic Acid ; Gp = GapmeR ; neg = négatif.

### 4. Extraction des ARN totaux (ARNt)

L'extraction des ARNt est réalisée à partir de cellules (150 000 cellules/puits dans une plaque 6 puits), transfectées et exposées au TGF- $\beta$  (cf. **protocole II.3**), à l'aide du kit miRNeasy Mini® (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont lysées par l'ajout de 700  $\mu$ L de Qiazol (Qiagen). Après avoir ajouté 140  $\mu$ L de chloroforme, les échantillons sont mélangés vigoureusement pendant 15 s et centrifugés pendant 15 min à 12 000 g et à 4 °C. 1,5 volume d'éthanol absolu (VWR Chemicals) est alors ajouté à la phase aqueuse préalablement récupérée. Ce mélange est ensuite transféré sur une colonne de type RNeasy® Mini puis centrifugé pendant 15 s à 8 000 g. 700  $\mu$ L de Tampon RWT (Qiagen) sont déposés sur la colonne avant d'être centrifugés pendant 15 s à 8 000 g. 500  $\mu$ L de tampon RPE (Qiagen)

sont ajoutés deux fois sur la colonne. Deux centrifugations (15 s à 8 000 g puis 2 min à 8 000 g) sont ensuite réalisées. Le tube collecteur de la colonne est changé et une nouvelle centrifugation est réalisée pendant 1 min à 17 000 g. L'élution des ARN est réalisée par l'ajout de 30  $\mu$ L d'eau « RNase free » (Qiagen) et une centrifugation de 1 min à 8 000 g. La concentration en ARNt est déterminée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop (ThermoFisher).

## 5. Extraction des protéines

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits (150 000 cellules/puits) puis transfectées et/ou exposées au TGF- $\beta$  (**cf. protocole II.3**). Les cellules sont incubées pendant 10 min sur glace dans du tampon RIPA (ThermoFisher) avant d'être récupérées à l'aide d'un grattoir puis collectées dans un tube. Les échantillons sont ensuite « soniqués » pendant 1 min puis centrifugés pendant 15 min à 14 000 g et à 4 °C afin de récupérer les surnageants.

## 6. Immunofluorescence

Les cellules sontensemencées dans des plaques de type Ibidi  $\mu$ -Dish 35 mm (Ibidi), à raison de 100 000 cellules par puits. Les cellules sont transfectées et/ou exposées au TGF- $\beta$  (**cf. protocole II.3**) puis fixées par du paraformaldéhyde 4% (VWR Chemicals) pendant 15 min puis perméabilisées grâce à une incubation de 10 min dans une solution de Triton X-100 à 0,1% (Sigma). Afin de saturer les sites non-spécifiques, les cellules sont incubées avec de la BSA 3% (Bovine Serum Albumin, Sigma) pendant 30 min à température ambiante avant d'être incubées avec les anticorps primaires (dilués dans de la BSA 1%, Sigma) dirigés contre  $\alpha$ -SMA (Abcam ab5694, 1/500<sup>ème</sup>) ou Ki-67 (Cell-signaling #9129, 1/500<sup>ème</sup>) pendant 1 h à 37 °C. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire fluorescent (AlexaFluor<sup>®</sup>488 goat anti-rabbit, 1/500<sup>ème</sup>, ThermoFisher) et de la phalloïdine (AlexaFluor<sup>®</sup>568 phalloïdine, 1/500<sup>ème</sup>, ThermoFisher) afin de marquer les fibres de stress, pendant 45 min à 37 °C. Une coloration des noyaux est réalisée avec du DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phénylindol, 1/1000<sup>ème</sup>, ThermoFisher) pendant 2 min à température ambiante. Du PBS (Phosphate Buffer Saline) (500  $\mu$ L) est ajouté dans chaque puits avant l'analyse en microscopie sur le Spinning Disk (Zeiss) au grossissement x40.

### III. Expression des ARN et miARN d'intérêt (tissulaires et cellulaires)

#### 1. Rétro-transcription (RT)

**ARN :** La rétro-transcription (RT) des ARN en ADN complémentaires (ADNc) est réalisée à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher) et d'un Thermocycleur Applied Biosystems® SimpliAmp® (ThermoFisher) sur 1 µg d'ARNt, selon les instructions du fournisseur.

**MiARN :** La RT est réalisée sur 5 ng d'ARNt à l'aide du kit Taqman™ microARN Reverse Transcription (ThermoFisher) et du Thermocycleur Applied Biosystems® SimpliAmp® selon les recommandations du fournisseur. La RT est réalisée avec des sondes Taqman spécifiques dont les références sont citées dans le **Tableau 12** (ThermoFisher).

Tableau 12 : Liste des essais (Taqman® gene assay) permettant la quantification des miARN.

miARN	Espèce	Gène	Assay ID
RNU44	Souris/Humain	RNU44	001094
U6	Souris/Humain	U6 snRNA	001973
miR-199a-3p	Souris/Humain	miR199a3p	002304
miR-199a-5p	Souris/Humain	miR199a	000498
miR-214-3p	Souris/Humain	miR214	002306

#### 2. PCR quantitative (qPCR)

**ARN :** Les qPCR sont réalisées en duplicat sur 1 µL de produit de RT, 10 µL de tampon Taqman™ Universal Master Mix II, no UNG (ThermoFisher) et de 1 µL de sonde Taqman (ThermoFisher) dont les références sont citées dans le **Tableau 13**. Le gène de la cyclophiline A, *PPIA* est utilisé comme référence afin de normaliser les résultats.

Tableau 13 : Liste des essais (Taqman® gene assay) permettant la quantification des gènes.

Gène	Assay ID souris	Assay ID humain
<i>PPIA</i>	Mm02342430	Hs99999994
<i>COL1A1</i>	Mm00801666	Hs00164004
<i>COL5A1</i>	Mm00489299	Hs00609133
<i>TGFB2</i>	Mm00436955	Hs00234244
<i>PDGFR</i>	Mm00435553	Hs01019589
<i>MMP2</i>	Mm00439498	Hs01548727
<i>FN1</i>	/	Hs00365058
<i>MAP3K11</i>	Mm00491529	Hs00176759

Les analyses par qPCR du gène *DNM3OS* sont réalisées en chimie SYBR Green® sur 1 µL de produit de RT dilué au 5<sup>ème</sup>, 10 µL de tampon Fast Sybr Green™ Master Mix (ThermoFisher) et 1 µL de sondes sens (F) et antisens (R) (Eurofins) dont les séquences sont citées dans le **Tableau 14**.

**Tableau 14 : Liste des amorces utilisées en chimie SYBR Green permettant la quantification de DNM3OS.**

Gènes	Primers Humains	Primers Souris
<b>PPIA</b>	F : GACCCAACACAAATGGTTCC	F : GACCAAACACAAACGGTTCC
	R : GGCCTCCACAATATTCATGC	R : TTCACCTTCCCAAAGACCAC
<b>DNM3OS</b>	F : AGCACTCCATGCTCGGTAAAG	F : TGAGAATGGCTGCTGTTACC
	R : TTGTGATGGGTGGGCTATTC	R : TTCACAAGACCTCTGCATCTC

**Micro-ARN :** Les qPCR sont réalisées en duplicat sur 1,4 µL de produit de RT, 10 µL de tampon Taqman Master Mix II, no UNG (ThermoFisher) et 1 µL de sondes Taqman (ThermoFisher) dont les références sont citées dans le **Tableau 12**. Les ARN (snoRNA, small nucleolar RNA) de référence utilisés sont *RNU44* pour les modèles cellulaires et *U6snRNA* pour les modèles murins.

L'amplification est réalisée sur l'automate StepOne Plus Real Time PCR System (ThermoFisher). L'analyse des données est effectuée selon la méthode comparative des  $\Delta\Delta Ct$  (Livak and Schmittgen, 2001). 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 à l'ARN de référence ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}}$ ). Le niveau d'expression relative RQ (Relative Quantification) de chaque échantillon est exprimé selon la relation  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (où  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon d'intérêt}} - \Delta Ct_{\text{échantillon contrôle}}$ ) (Livak and Schmittgen, 2001).

### 3. Séquençage (RNA-seq)

Une étude transcriptomique par séquençage des ARN (RNA-seq) a été réalisée sur des échantillons provenant de cellules transfectées avec les prémiR-199a-5p, prémiR-199a-3p (en comparaison du prémiR neg) et sur les cellules transfectées avec le GapmeR dirigé contre DNMT3OS et exposées au TGF- $\beta$  (en comparaison du GapmeR neg). Trois expérimentations indépendantes par condition ont été réalisées. Dans un premier temps, la qualité des ARN a été vérifiée grâce au kit Agilent RNA 6000 Nano et au bioanalyser Agilent 2100 (Agilent). Le séquençage a été réalisé à partir d'1  $\mu$ g d'ARN total à l'aide de la plateforme BGISEQ-500 (Zhu *et al.*, 2018). Dans un premier temps, les ARN sont rétro-transcrits en ADNc puis amplifiés par PCR. L'ADNc est ensuite cyclisé et une purification est réalisée grâce à des billes magnétiques présentant un fragment poly-T. Les ADNc sélectionnés sont fragmentés de manière aléatoire en fragment de 100 pb (paires de bases). Les « reads » « de meilleure qualité, correspondant à un total de 66 M de reads ont été alignés par rapport au génome humain (GCF\_000001405.38\_GRCh38.p12) à l'aide du logiciel HISAT (Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts) (Kim, Langmead and Salzberg, 2015). La quantification des transcrits est réalisée à l'aide du logiciel RSEM (RNA-seq by Expectation Maximization) (Li and Dewey, 2011). Les analyses des gènes différentiellement exprimés ont, quant à elles, été réalisées à la fois à l'aide du logiciel Dr.Tom, fourni par la société BGI et par le Dr B.Mari de l'IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire) de Nice à l'aide des logiciels en ligne TargetScan (<http://targetscan.com>), miRONTOP (<https://www.genomique.info>) pour déterminer les cibles prédites de chacun des miARN et du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA <http://ingenuity.com>) afin d'analyser les réseaux biologiques. La normalisation et les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du module DSeq2 et les fold change (en log2) ont été choisis en fonction des analyses. Pour les tests multiples, les p-value sont ajustées selon la méthode de Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) afin de contrôler le taux de fausse découverte (FDR, False Discovery Rate). Les gènes exprimés de manière différentielle sont sélectionnés selon une p-value ajustée inférieure à 0,05.

## IV. Western Blot

### 1. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées en microplaque 96 puits à l'aide du kit Pierce™ BCA (BiCinchoninic acid Assay) Protein Assay (ThermoFisher) selon les instructions du fournisseur. Une gamme de BSA de 0 à 2000 µg/mL est réalisée. La mesure de l'absorbance est réalisée sur l'appareil MultiskanFC (ThermoFisher).

### 2. Immunoblot

Pour chaque échantillon, un mélange réactionnel de 25 µL contenant 10 µg de protéines, du tampon LDS 4x (Lithium Dodécylsulfate, ThermoFisher), de l'agent réducteur 10X (ThermoFisher) est préparé. Les protéines sont dénaturées par incubation pendant 10 min à 70°C dans un bain sec. Les protéines sont séparées sur des gels de polyacrylamide pré-coulés de type 4-12% Bis-Tris Plus ou 7% Tris-Acétate (ThermoFisher) avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioRad) à l'aide de l'appareil Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad) selon les recommandations du fournisseur.

Afin de saturer les sites de fixation non spécifiques, les membranes sont incubées pendant 1 h dans une solution de lait/TBST 5% (Tris-Buffered Saline, 0,1% Tween 20). Après une étape de lavage au TBST, les anticorps primaires sont incubés aux concentrations décrites dans le **Tableau 15** pendant 1 nuit à 4°C sous agitation. Les membranes sont ensuite lavées au TBST et incubées avec les anticorps secondaires couplés à l'HRP (HorseRadish Peroxidase) correspondants (**Tableau 15**) pendant 1 h à température ambiante sous agitation. La révélation en chimio-luminescence est ensuite réalisée à l'aide du kit ECL™ Select™ Western Blotting Detection Reagent (Cytiva) et de l'imageur Fusion Fx Spectra (Vilber Lourmat).

**Tableau 15 : Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés**

Protéine d'intérêt	Taille	Référence	Anticorps I <sup>aire</sup>	Anticorps II <sup>aire</sup>
Fibronectine	260 kDa	ab2413 (Abcam)	lapin 1/1000 <sup>ème</sup>	Anti-lapin 1/5000 <sup>ème</sup>
HSP 60	60 kDa	Sc-1722 (Santa Cruz)	Chèvre 1/4000 <sup>ème</sup>	Anti-chèvre 1/20000 <sup>ème</sup>
α-SMA	42 kDa	59-M02 (Abnova)	Souris 1/2000 <sup>ème</sup>	Anti-souris 1/20000 <sup>ème</sup>
β-Actine	40 kDa	Sc-130656 (Santa Cruz)	Souris	Anti-souris 1/10000 <sup>ème</sup>

HSP = Heat Shock Protein

## **VI. Quantification du collagène par coloration au rouge sirius (Sircol<sup>®</sup>, Biocolor)**

### **1. Modèles animaux**

Le dosage est réalisé sur un échantillon de foie (20-30 mg). Afin d'être digéré, le tissu est incubé avec un réactif de fragmentation (Biocolor) dans un bain sec à 65 °C pendant 2 à 3 h et mélangé vigoureusement toutes les 30 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 13 000 g. Le dosage est réalisé à l'aide du kit Sircol<sup>®</sup> (Biocolor) sur 50 µL de surnageant, selon les recommandations du fournisseur. Une gamme de concentrations connues de collagène (0, 20, 40 et 60 µg) est préparée en parallèle. L'absorbance est mesurée à l'aide du MultiskanFC (ThermoFisher) à 556 nm. La quantité de collagène dans chaque échantillon est calculée par rapport à la gamme de concentration et la quantité de tissu.

### **2. Modèle cellulaire**

Les cellules sont ensemencées dans une plaque 6 puits (150 000 cellules/puits) puis transfectées (avec les prémiR/LNA/gapmer) et exposées au TGF-β (**cf. protocole II.3**). Afin de digérer la MEC et de libérer le collagène en solution, 2 mL d'une solution de pepsine à 0,1 mg/mL (Sigma) dans de l'acide acétique 0,5 M sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant une nuit à 4 °C. 1 mL de lysat est alors transféré dans des tubes « protein low bind » (Eppendorf) contenant 100 µL d'un réactif permettant de neutraliser l'acidité et 200 µL d'un réactif de concentration (Biocolor). Les tubes sont placés une nuit à 4 °C dans un mélange eau/glace. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 12 000 g. Le dosage du collagène est réalisé à l'aide du kit Sircol<sup>®</sup> (Biocolor) sur 300 µL de surnageant selon les recommandations du fournisseur. Une gamme de concentrations connues de collagène (0, 5, 10 et 15 µg) est préparée en parallèle. L'absorbance est mesurée à l'aide du MultiskanFC (ThermoFisher) à 556 nm. La quantité de collagène dans chaque échantillon est calculée par rapport à la gamme de concentration.

## VII. RNA-FISH (RNAscope®)

### 1. Modèles animaux et biopsie humaine

Des coupes histologiques de foie de souris (ou provenant de patients) incluses en paraffine (FFPE) sont, dans un premier temps, déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de xylène et d'éthanol (100%, 95%, 70%) puis dans un bain d'eau milliQ. Le RNA-FISH (RNA Fluorescence In Situ Hybridization) de type RNAscope® est réalisé à l'aide du kit Multiplex Fluorescent Reagent Kit V2 (Advanced Cell Diagnostics) selon les recommandations du fournisseur. Après avoir digéré les tissus par du peroxyde d'hydrogène (Advanced Cell Diagnostics), les sites spécifiques sont démasqués grâce au réactif « target retrieval » (Advanced Cell Diagnostics) à une température de 99 °C dans un cuit-vapeur. Les tissus sont ensuite digérés par une protéase à 40 °C avant hybridation des sondes dirigées contre *mmu-Dnm3os* et *mmu-Acta2* ou *hsa-DNM3OS* et *hsa-ACTA2* (conçues par Advanced Cell Diagnostics). Chaque signal est alors amplifié avant d'être développé et marqué par des fluorochromes Opal (Perkin Elmer) selon les recommandations du fournisseur. Une solution de DAPI (Advanced Cell Diagnostics) permet de colorer les noyaux des cellules. L'acquisition est réalisée à l'aide du scanner de lames Axio Scan Z1 (Zeiss) à un grossissement x20.

### 2. Modèle cellulaire

Des cellules LX-2 sontensemencées dans des Ibidi µ-Dish 35 mm (Ibidi) (100 000 cellules/puits) et transfectées avec le GapmeR dirigé contre DN3M3OS puis exposées au TGF-β, 48 h après transfection (**cf. protocole II.3**). Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 min dans du paraformaldéhyde 4% (VWR Chemicals) afin d'être fixées. Le RNAscope® est réalisé à l'aide du kit Multiplex Fluorescent Reagent Kit V2 (Advanced Cell Diagnostics). Les cellules sont incubées dans du peroxyde d'hydrogène avant d'être digérées par une protéase. Les cellules sont incubées pendant 2 h à 40 °C avec des sondes dirigées contre *hsa-DNM3OS* et *hsa-ACTA2* (Advanced Cell Diagnostics). Chaque signal est alors amplifié avant d'être développé et marqué par des fluorochromes Opal (Perkin Elmer) selon les recommandations du fournisseur. Une coloration au DAPI (Advanced Cell Diagnostics) permet de marquer les noyaux des cellules. Du PBS est ajouté dans les puits en attendant l'acquisition, réalisée à l'aide du LSM710 Airyscan (Zeiss) à un grossissement x40.

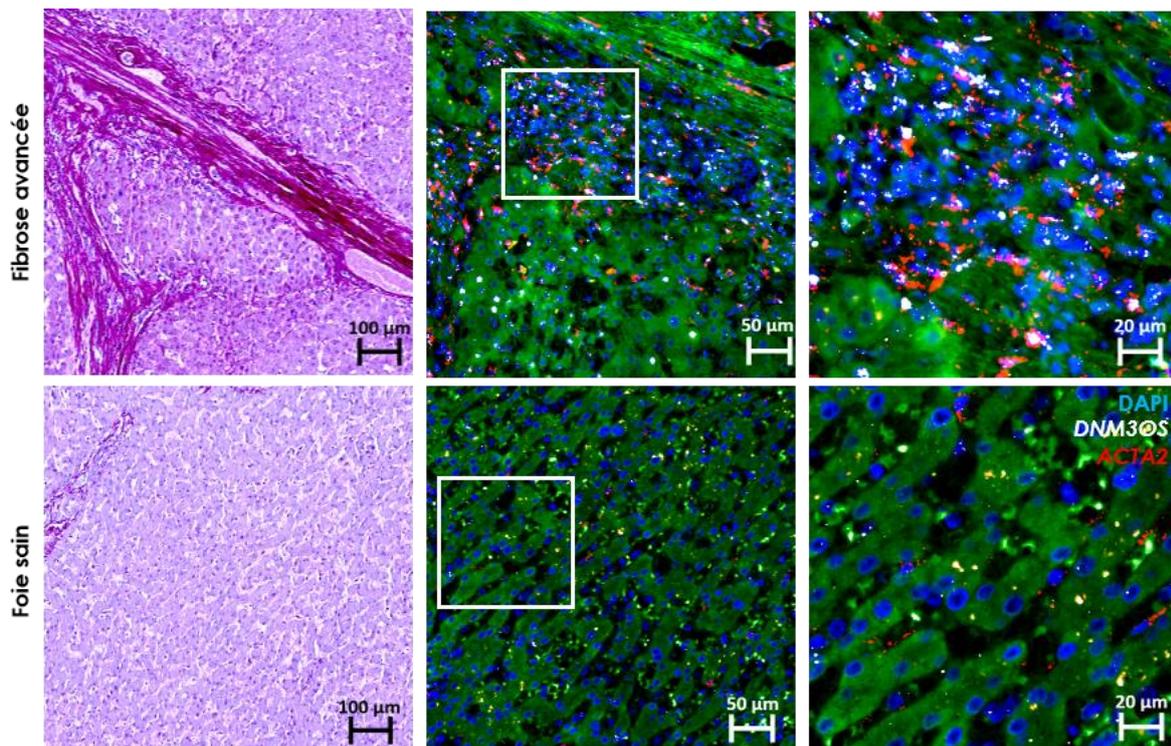
## **VIII. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8<sup>®</sup>. Il s'agit d'un test de Student paramétrique (les variances ont été considérées comme étant égales). Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ . Les résultats sont présentés sous la forme moyenne  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean).

## D. Résultats

### I. Expression de DNM3OS sur une biopsie de patient atteint de fibrose hépatique

La pertinence clinique de l'étude du long ARN non codant DNM3OS dans la fibrose hépatique a été appréhendée par RNA-FISH (RNAscope®) sur la biopsie d'un patient atteint de fibrose hépatique avancée. On observe sur les clichés réalisés en microscopie confocale et présentés **Figure 41**, par comparaison à une biopsie de tissu sain, que le transcrit primaire *DNM3OS* est exprimé dans les noyaux des cellules positives pour *ACTA2*, gène codant l' $\alpha$ -SMA (marqueur de différenciation des fibroblastes en myofibroblastes), et ce, au niveau des lésions de fibrose colorées au rouge sirius.



**Figure 41 : Expression de DNM3OS sur une biopsie de patient atteint de fibrose hépatique avancée et une biopsie contrôlée.** Expression de *DNM3OS* (blanc) et *ACTA2* (rouge) sur une biopsie de patient atteint de fibrose hépatique avancée dans une zone présentant des lésions de fibrose. Une biopsie de tissu sain a été utilisée comme contrôle. Le DAPI colore les noyaux des cellules en bleu ; le vert représente l'auto-fluorescence du tissu.

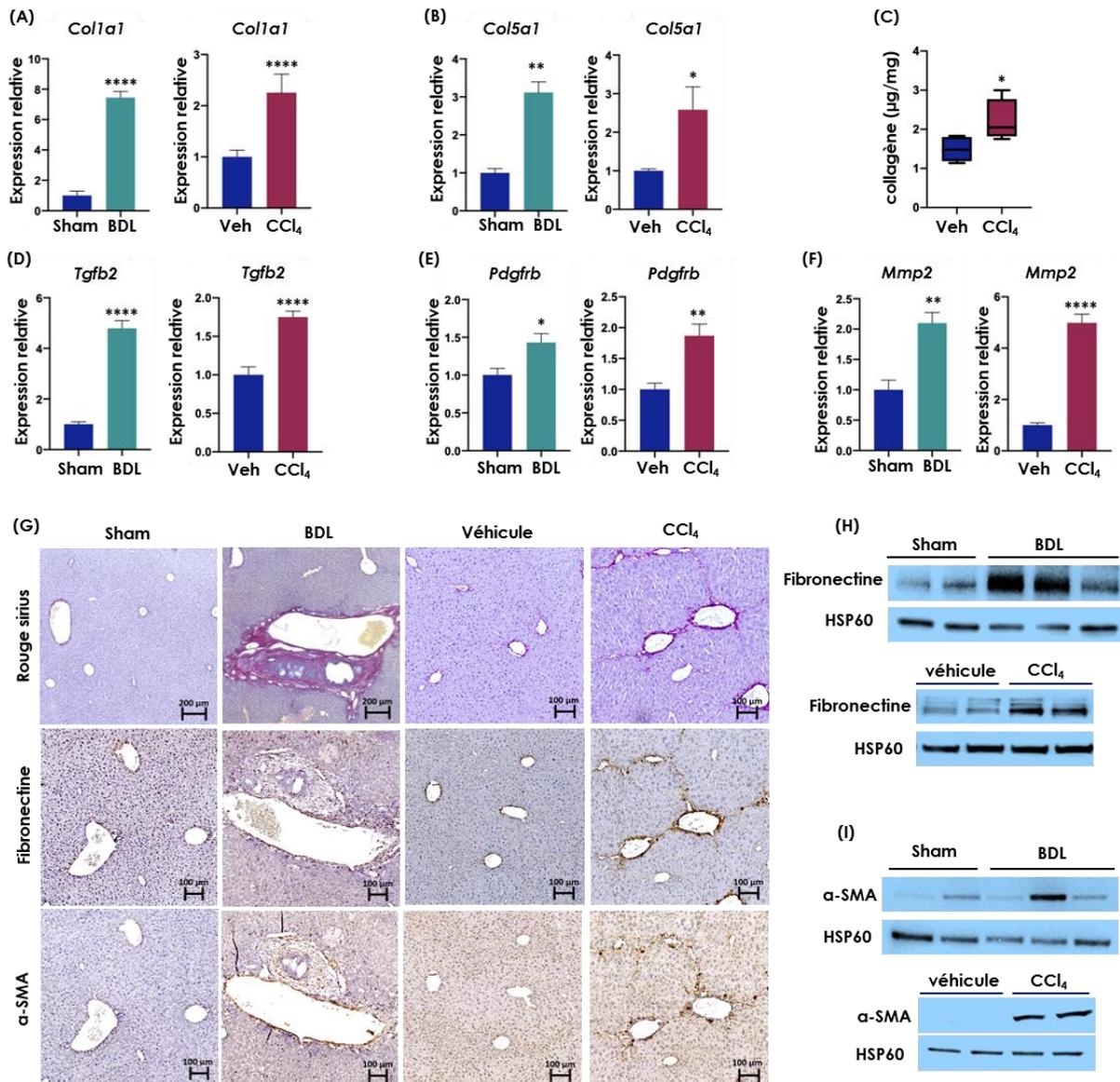
## II. Modèles murins de fibrose hépatique

### 1. L'obstruction des voies biliaires et l'administration de CCl<sub>4</sub> induisent des lésions de fibrose chez la souris

Deux protocoles expérimentaux ont été testés. D'une part, des souris C57BL/6 ont subi une obstruction des voies biliaires (BDL, Bile Duct Ligation) 6 jours avant le sacrifice et le prélèvement des tissus. Des souris contrôles (« sham ») ont subi la même intervention mais sans obstruction biliaire. D'autre part, des souris Balb/C ont reçu deux injections par semaine de CCl<sub>4</sub> 5% (dilué dans de l'huile de maïs) à une dose de 4 mL/kg ou de l'huile de maïs pendant 6 semaines. Afin de caractériser ces deux modèles de fibrose hépatique, nous avons mesuré l'expression de marqueurs de fibrose souvent évalués dans la littérature (Lurie *et al.*, 2015), notamment les constituants de la MEC dont le collagène et la fibronectine, les facteurs de croissance (TGF- $\beta$ , PDGF) ou encore les métalloprotéinases (MMP-2).

Les modèles d'obstruction des voies biliaires et d'administration de CCl<sub>4</sub> induisent, comme attendu, des lésions de fibrose caractérisées par une augmentation significative de l'expression génique des collagènes de type I (**Figure 42.A**) et de type V (**Figure 42.B**) ainsi qu'une augmentation des concentrations tissulaires de collagène (Sircol®) (**Figure 42.C**). De plus, ces deux modèles induisent une induction significative de l'expression de *Tgfb2* (**Figure 42.D**), de *Pdgfrb* (**Figure 42.E**) et de *Mmp2* (**Figure 42.F**).

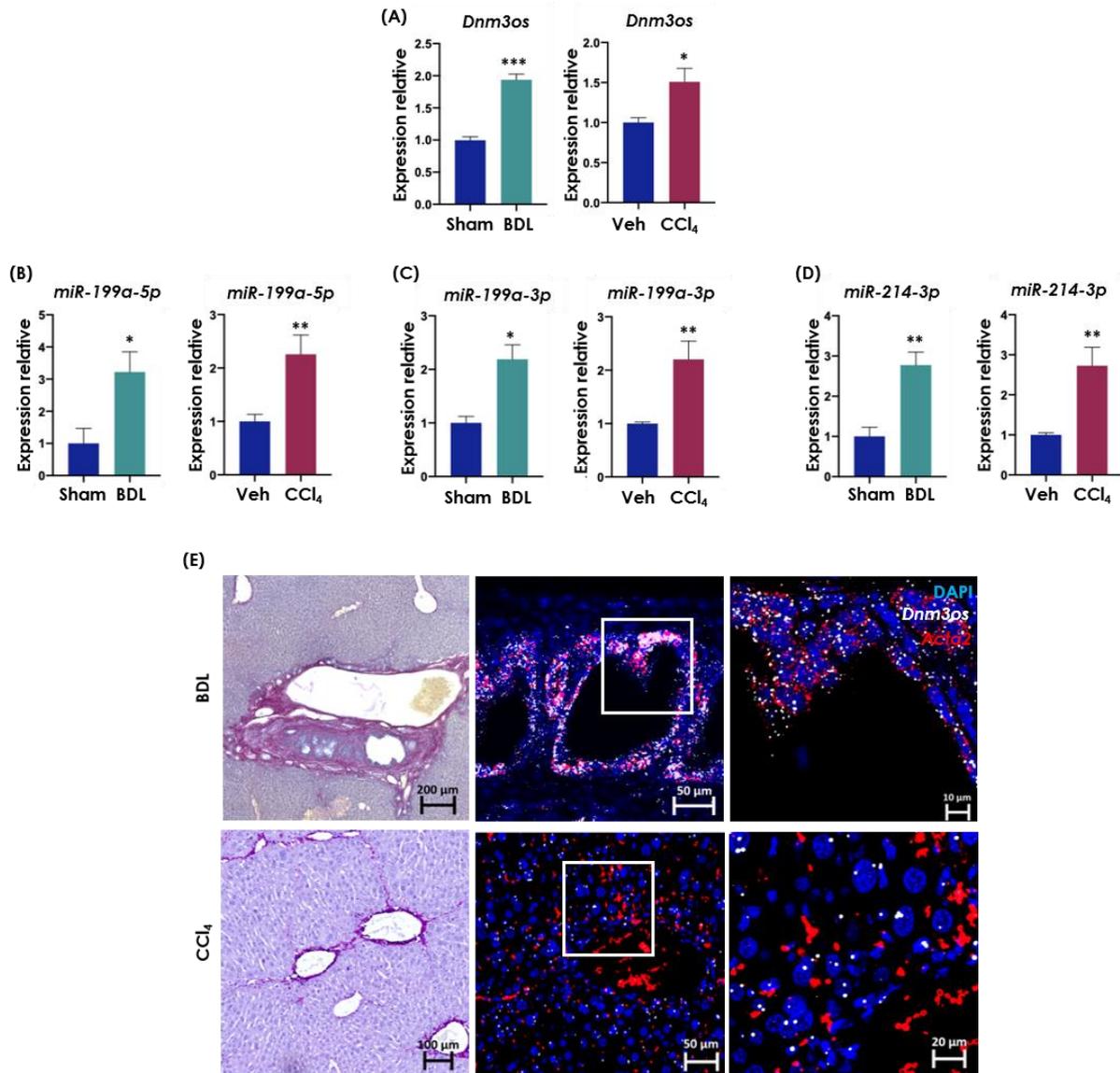
L'analyse histologique des foies par coloration au rouge sirius indique un dépôt excessif de collagène dans le modèle BDL principalement au niveau des canaux biliaires dilatés et, chez les souris ayant reçu du CCl<sub>4</sub>, dans les zones centro-lobulaires en formant des ponts fibreux entre les veines centro-lobulaires de deux lobules. Des résultats similaires sont obtenus pour les marquages immunohistochimiques de la fibronectine et de l' $\alpha$ -SMA (**Figure 42.G**). On observe également par western blot, une surexpression de la fibronectine (**Figure 42.H**) et de l' $\alpha$ -SMA (**Figure 42.I**) dans les deux modèles.



**Figure 42 : L'obstruction des voies biliaires et l'administration de CCl<sub>4</sub> induisent des lésions de fibrose hépatique.** (A-B) Expression du collagène de type 1 *Col1a1* et du collagène de type 5 *Col5a1* par RT-qPCR. Les données sont normalisées par rapport au gène de ménage *ppia* ; (C) dosage colorimétrique du collagène au rouge sirius (Sircol®) ; (D-F) Expression des *Tgfb2*, *Pdgfr* et *Mmp2* par RT-qPCR. Les données sont normalisées par rapport au gène de ménage *Ppia* ; (G) Coloration histologique du collagène au rouge sirius et marquage immunohistochimique de la fibronectine et de l'α-SMA. La barre d'échelle correspond à 100 µm ; (H-I) Expression de la fibronectine et de l'α-SMA par western blot. HSP60 a été utilisé comme contrôle. n=3 souris sham ; n=6 souris BDL ; n=5 souris véhicule ; n=5 souris CCl<sub>4</sub> ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\*\* : p < 0,0001 ; BDL = obstruction des voies biliaires, Veh = véhicule, CCl<sub>4</sub> = tétrachlorométhane.

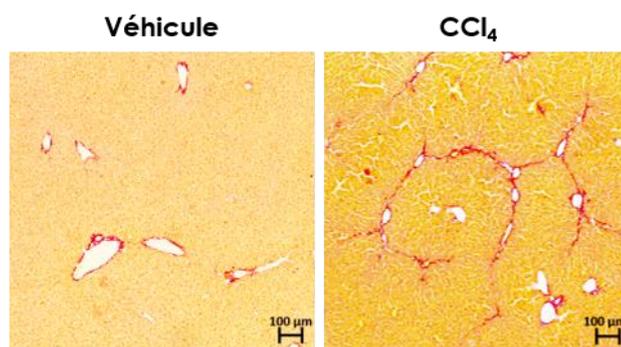
## 2. L'obstruction des voies biliaires et l'administration de CCl<sub>4</sub> induisent l'expression de DNM3OS et des microARN miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p chez la souris

L'obstruction des voies biliaires ainsi que l'administration de CCl<sub>4</sub> induisent une surexpression significative de *Dnm3os* par RT-qPCR (**Figure 43.A**) ainsi que des 3 microARN dont il est le précurseur, *miR-199a-5p*, *miR-199a-3p* et *miR-214-3p* (**Figure 43.B-D**). De manière intéressante, nous observons dans les deux modèles que *Dnm3os* est exprimé dans les noyaux des cellules positives pour *Acta2* ( $\alpha$ -SMA) et ce, dans les zones présentant des lésions de fibrose (**Figure 43.E**).



**Figure 43 : L'obstruction des voies biliaires et l'administration de CCl<sub>4</sub> induisent l'expression de DNM3OS et de miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p.** (A – D) Expression par RT-qPCR de *Dnm3os* et des 3 microARN dont il est le précurseur. Les données sont normalisées par rapport à *Ppia* pour *Dnm3os* et par rapport à *U6* pour les 3 microARN ; (E) Analyse RNA-FISH (RNAscope®) montrant l'expression de *Dnm3os* (blanc) dans les noyaux des cellules positives pour *Acta2* (rouge) dans les zones présentant des lésions de fibrose caractérisées par une coloration au rouge sirius. Le DAPI colore les noyaux des cellules en bleu. n=3 souris sham ; n=6 souris BDL ; n=5 souris véhicule ; n=5 souris CCl<sub>4</sub> ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,001. BDL = obstruction des voies biliaires, Veh = véhicule, CCl<sub>4</sub> = tétrachlorométhane.

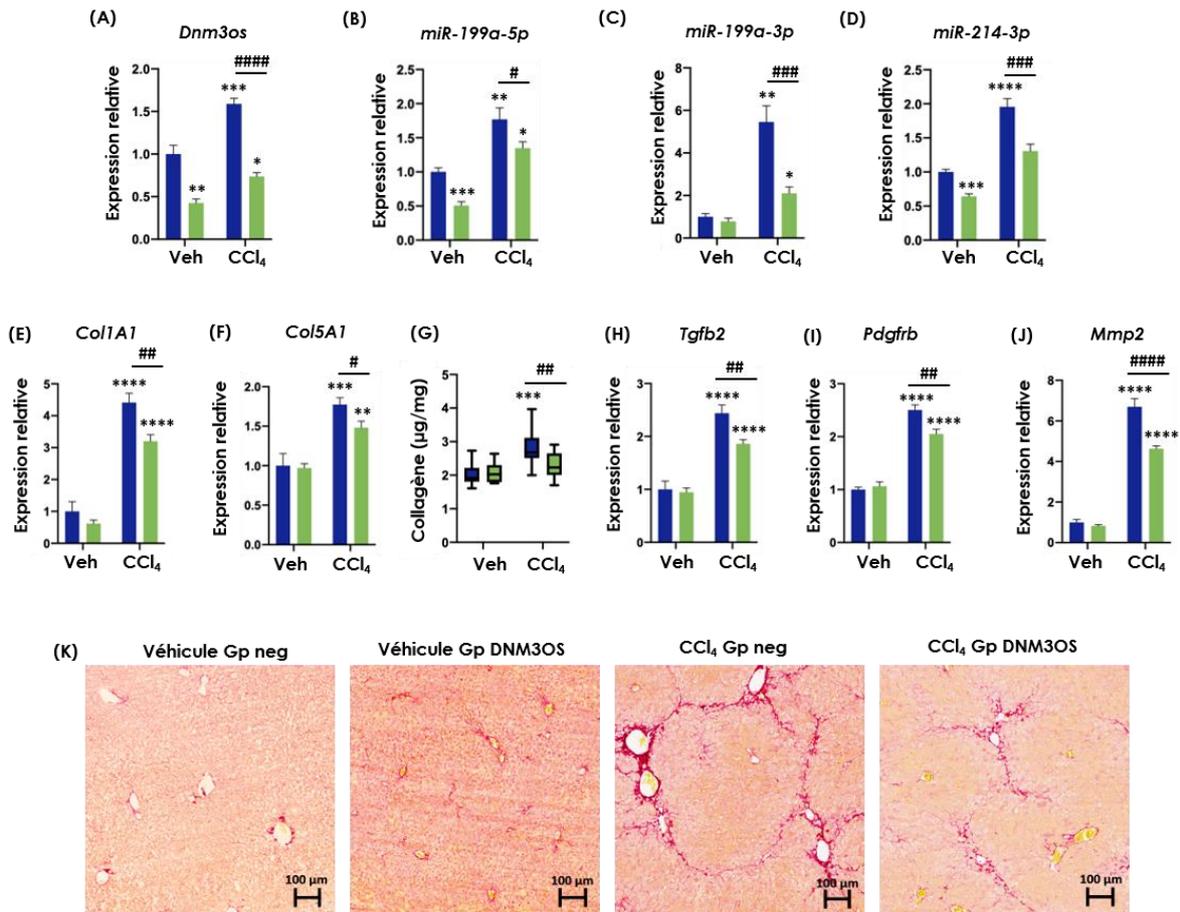
Enfin, nous confirmons que trois semaines d'administration de CCl<sub>4</sub> suffisent pour induire des lésions de fibrose, caractérisées par la présence de dépôts de collagène (Figure 44).



**Figure 44 :** L'administration de  $\text{CCl}_4$  pendant trois semaines induit des lésions de fibrose. Coloration histologique du collagène au rouge sirius réalisée sur des coupes provenant d'une souris contrôle (véhicule) et d'une souris ayant reçu du  $\text{CCl}_4$  pendant trois semaines.

### 3. Effets de l'administration d'un oligonucléotide anti-sens (GapmeR) dirigé contre DNM3OS dans le modèle $\text{CCl}_4$

Les résultats précédents nous ont conduits à évaluer l'effet potentiellement curatif de l'administration d'un oligonucléotide anti-sens de type GapmeR dirigé contre DNM3OS dans le modèle de fibrose hépatique induite par administration de  $\text{CCl}_4$ . Une fois le processus de fibrose initié par l'administration de  $\text{CCl}_4$  pendant 3 semaines (**Figure 45**), les souris ont reçu des injections intra-péritonéales de GapmeR dirigé contre DNM3OS à 10 mg/kg, deux fois par semaine pendant 3 semaines (en parallèle d'injections de  $\text{CCl}_4$ ). Nous avons validé que l'inhibition de *Dnm3os* et de ses trois microARN (**Figure 45.A-D**) est associée à la diminution significative de l'expression des collagènes de type I (*Col1a1*) (**Figure 45.E**) et de type V (*Col5a1*) (**Figure 45.F**). Ces résultats ont été confirmés par un dosage colorimétrique au rouge sirius (Sircol®) permettant de quantifier le collagène total (**Figure 45.G**). De même, nous observons une diminution significative de l'expression du *Tgfb2* (**Figure 45.H**), du récepteur bêta au PDGF (*Pdgfrb*) (**Figure 45.I**) et de *Mmp2* (**Figure 45.J**). D'un point de vue fonctionnel, l'administration d'un GapmeR dirigé contre DNM3OS permet de limiter les lésions de fibrose, comme en atteste la diminution des dépôts de collagène observée (**Figure 45.K**).



**Figure 45 : Effets de l'inhibition de DNM3OS sur les lésions de fibrose hépatique induites par l'administration de CCl<sub>4</sub>.** (A-D) Expression par RT-qPCR de *Dnm3os* et des 3 microARN dont il est le précurseur. Les données ont été normalisées par rapport au gène de ménage *Ppia* pour *dnm3os* et *U6* pour les microARN ; (E-F) Expression par RT-qPCR du collagène *Col1A1* et *Col5A1*. *Ppia* a été utilisé comme gène de ménage ; (G) Dosage colorimétrique du collagène au rouge sirius (Sircol®) ; (H-J) Expression par RT-qPCR de *Tgfb2*, *Pdgfrb* et *Mmp2*. Les données ont été normalisées par rapport à *Ppia* ; (K) Coloration histologique au rouge sirius. n = 5 souris véhicule/Gp neg ; 5 souris véhicule/Gp DNM3OS ; 15 souris CCl<sub>4</sub>/Gp neg et 14 souris CCl<sub>4</sub>/Gp DNM3OS. \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,001 ; \*\*\*\* : p < 0,0001 ; # : p < 0,05 ; ### : p < 0,001 ; ##### : p < 0,0001. Veh = véhicule ; CCl<sub>4</sub> = tétrachlorométhane ; Gp = GapmeR ; neg = négatif.

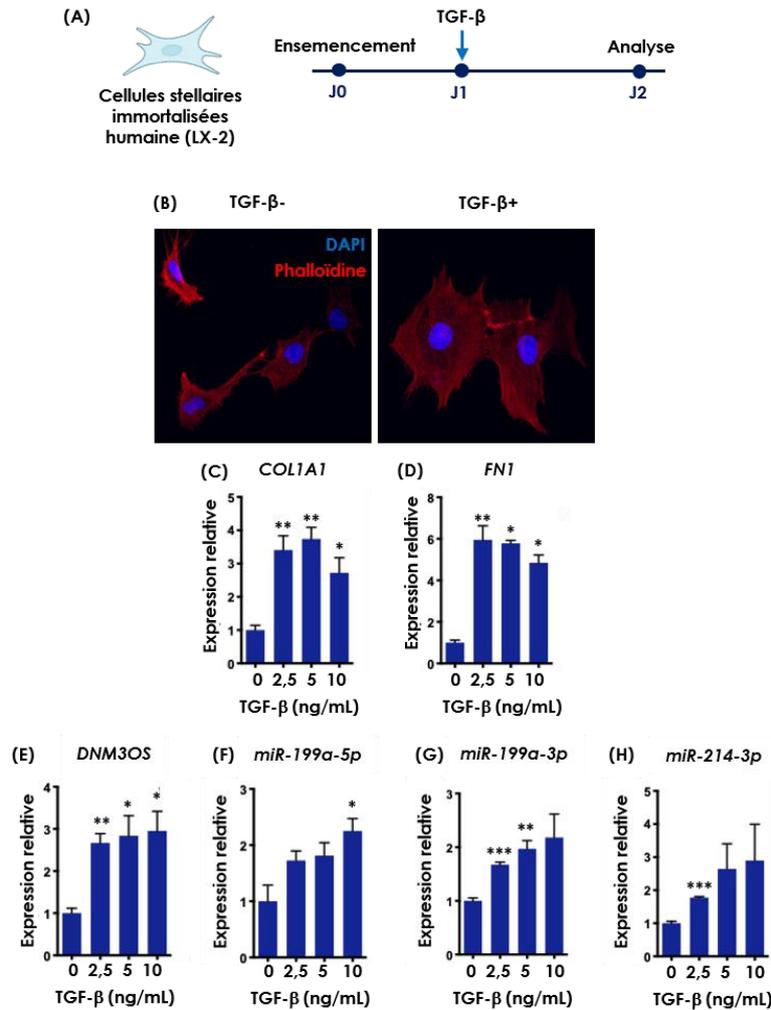
### III. Modèle cellulaire – Etude par perte et gain de fonction

Afin d'évaluer l'effet de DNM3OS et de son inhibition au niveau cellulaire, nous avons choisi de réaliser des études de perte et de gain de fonction dans la lignée LX-2, une lignée humaine de cellules stellaires.

#### 1. Effets du TGF-β sur la lignée LX-2

Dans un premier temps, les cellules LX-2 sont stimulées par des concentrations croissantes de TGF-β pendant 24 h (Figure 46.A). Le TGF-β induit une modification de la morphologie des cellules (Figure 46.B) ainsi qu'une augmentation significative de l'expression du collagène de

type 1 (*COL1A1*) (Figure 46.C) et de la fibronectine (*FN1*) (Figure 46.D), et ceci quelle que soit la concentration de TGF- $\beta$  utilisée. Nous avons, dans un second temps, observé que l'expression de *DNM3OS* et des trois microARN *miR-199a-5p*, *miR-199a-3p* et *miR-214-3p* est significativement augmentée indépendamment des concentrations de TGF- $\beta$  utilisées (Figure 46.E-H).

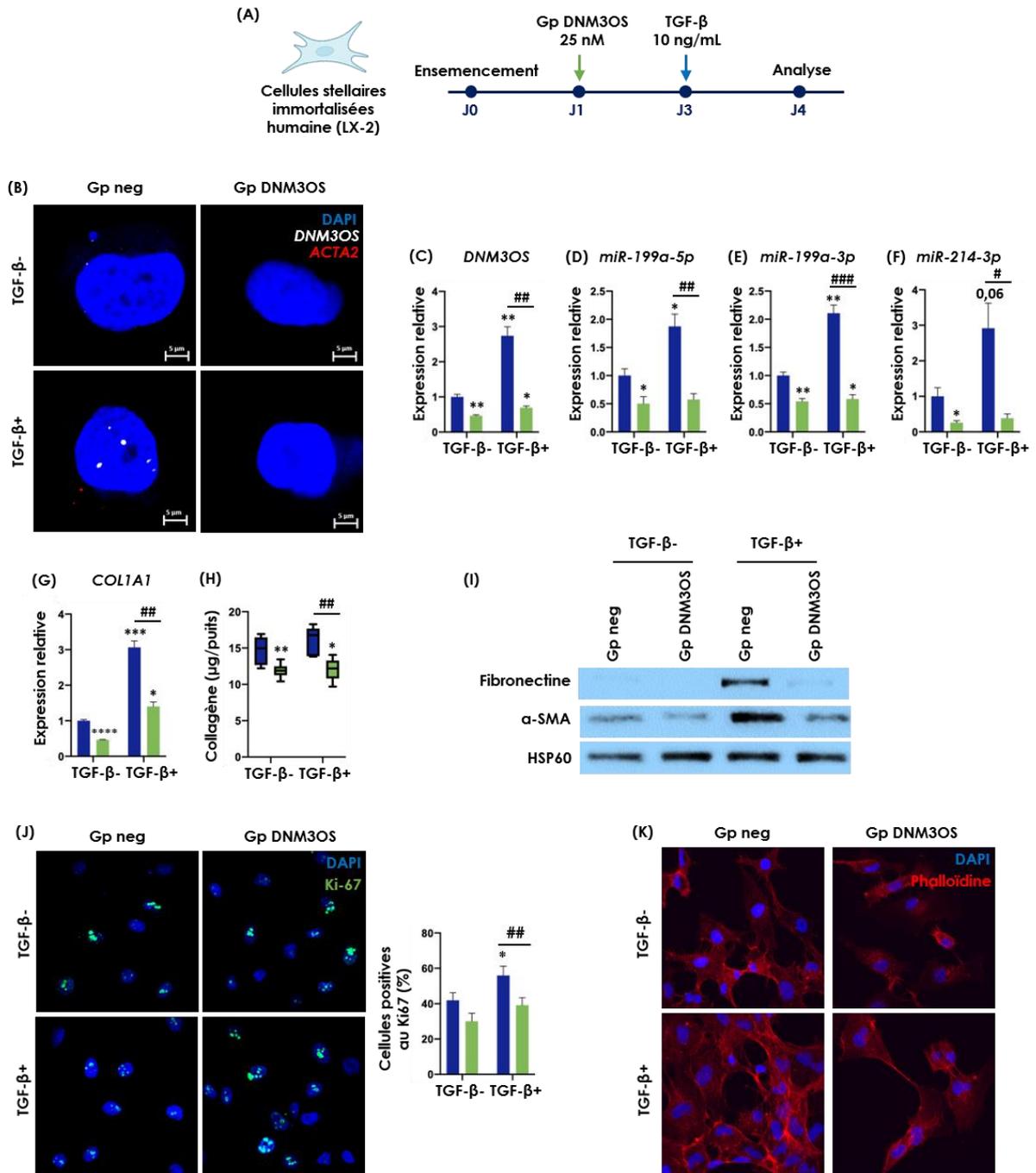


**Figure 46 : Effets du TGF- $\beta$  sur la lignée immortalisée de fibroblastes hépatiques (LX-2).** (A) Les cellules sont exposées pendant 24 h à des concentrations croissantes de TGF- $\beta$  ; (B) Marquage à la phalloïdine en microscopie confocale (grossissement x40). Le DAPI colore les noyaux des cellules en bleu ; (C-D) Expression du collagène de type 1 (*COL1A1*) et de la fibronectine (*FN1*) par RT-qPCR ; (E-H) Expression par RT-qPCR de *DNM3OS* et des trois microARN, *miR-199a-5p*, *miR-199a-3p* et *miR-214-3p*. Les données sont normalisées par rapport à *PPIA* pour *COL1A1*, *FN1*, *DNM3OS* et par rapport à *RNU44* pour les trois microARN. n=3 expositions indépendantes. \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,001.

## 2. Effets de la perte de fonction de DNM3OS

Les cellules LX-2 sont transfectées par un oligonucléotide anti-sens de type GapmeR dirigé contre DNM3OS à une concentration de 25 nM. 48 h après transfection, les cellules sont exposées pendant 24 h au TGF- $\beta$  10 ng/mL (**Figure 47.A**).

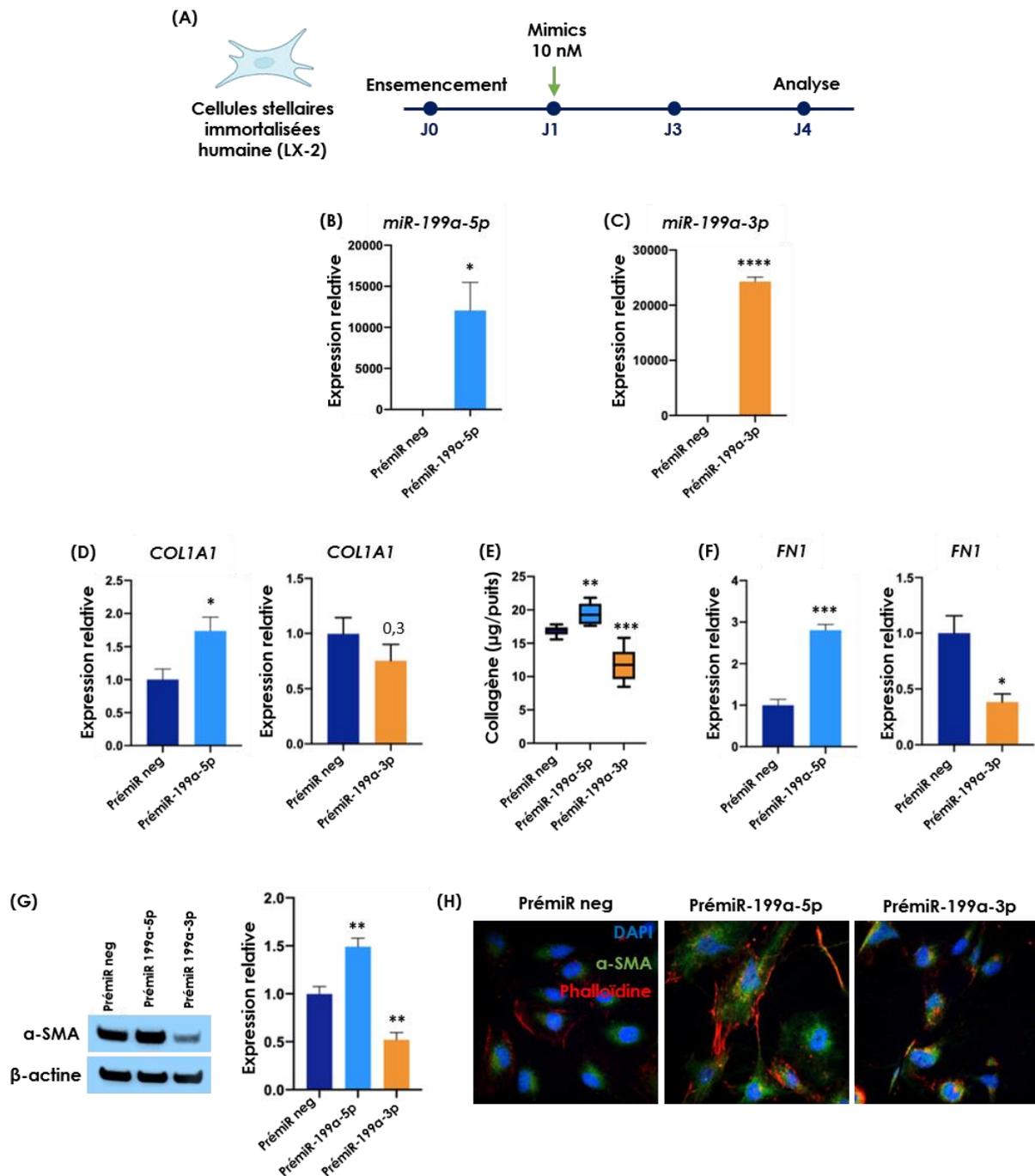
Une analyse en RNA-FISH (RNAscope<sup>®</sup>) confirme la localisation de *DNM3OS* dans les noyaux des cellules positives pour *ACTA2* lorsque les cellules sont activées par le TGF- $\beta$ . Comme attendu, la transfection des cellules par un GapmeR dirigé contre DNM3OS permet d'inhiber, en absence ou en présence de TGF- $\beta$  à 10 ng/mL, l'expression de *DNM3OS* (**Figure 47.B-C**) ainsi que celle des microARN, *miR-199a-5p*, *miR-199a-3p* et *miR-214-3p* (**Figure 47.D-F**). L'inhibition de DNM3OS est associée à une atténuation du phénotype fibrotique représenté par une diminution de l'expression du collagène de type 1 (*COL1A1*) et par le dosage colorimétrique du collagène total au rouge sirius (Sircol<sup>®</sup>) (**Figure 47.G-H**). On observe également par western blot, une diminution de la fibronectine et de l' $\alpha$ -SMA (**Figure 47.I**). Le suivi du marquage de Ki67 indique que l'inhibition de DNM3OS induit une diminution de la prolifération cellulaire (**Figure 47.J**). De plus, une diminution du stress cellulaire, représenté par le marquage des filaments d'actine à la phalloïdine, est observée (**Figure 47.K**).



**Figure 47 : Effets de l'inhibition de DN3M3OS dans la lignée LX-2.** (A) Les cellules LX-2 sont transfectées par un GapmeR dirigé contre DN3M3OS puis exposées au TGF-β ; (B) Analyse RNA-FISH (RNAscope®) de *DN3M3OS* (blanc) et *ACTA2* (rouge). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu) ; (C-F) Expression de *DN3M3OS* et des 3 microARN dont il est le précurseur (*miR-199a-5p*, *miR-199a-3p*, *miR-214-3p*) par RT-qPCR ; (G) Expression du collagène *COL1A1* par RT-qPCR. Les données sont normalisées par rapport à *PPIA* pour *DN3M3OS* et *COL1A1* et par rapport à *RNU44* pour les 3 microARN ; (H) Dosage colorimétrique du collagène au rouge sirius (Sircol®) ; (I) Expression de l'α-SMA et de la fibronectine par western blot. HSP60 a été utilisé comme contrôle ; (J) Images représentatives du marquage de Ki-67 par immunofluorescence et quantification des cellules positives au Ki-67 ; (L) Images représentatives du marquage des fibres de stress à la phalloïdine par immunofluorescence. n=3 expérimentations indépendantes et n=2 expérimentations indépendantes pour l'immunofluorescence et le RNA-FISH ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,001 ; \*\*\*\* : p < 0,0001 ; # : p < 0,05 ; ## : p < 0,01 ; ### : p < 0,001. Gp = GapmeR ; neg = négatif.

### 3. Effets du gain de fonction des microARN miR-199a-5p et miR-199a-3p

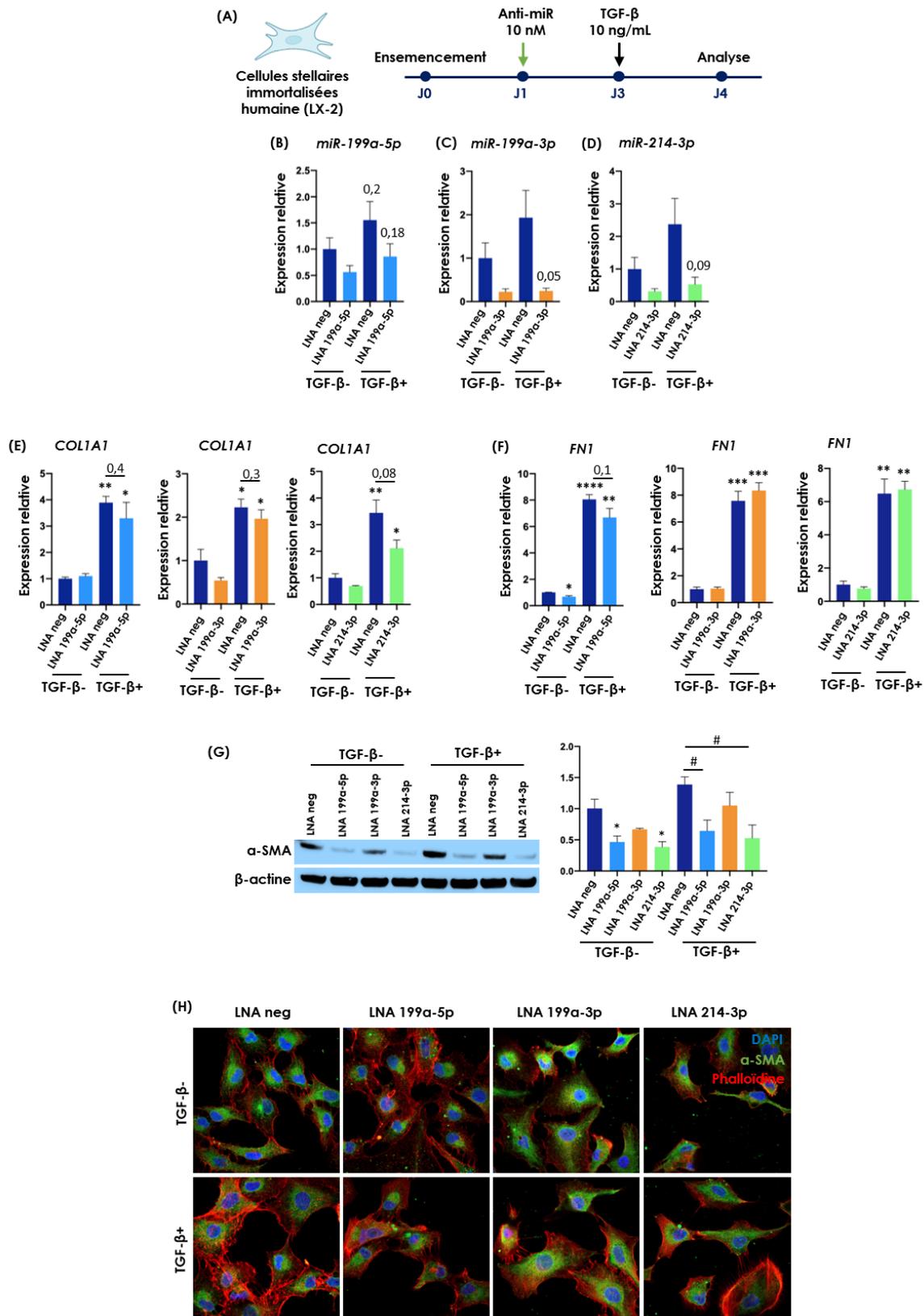
Les cellules sont transfectées par des précurseurs (PrémiR) des microARN miR-199a-5p et miR-199a-3p à une concentration de 10 nM (**Figure 48.A**). L'utilisation de prémiR 214-3p dans la lignée LX-2 s'est avérée toxique à 5 et 10 nM, quel que soit le fournisseur choisi. Ainsi, nous avons confirmé qu'après transfection, les deux microARN miR-199a-5p et miR-199a-3p sont surexprimés (**Figure 48.B-C**). De manière intéressante, seule la surexpression de miR-199a-5p est associée à l'induction d'un phénotype fibrotique, caractérisé par une augmentation des niveaux d'expression de constituants de la MEC notamment le collagène, (**Figure 48.D-E**) et la fibronectine (**Figure 48.F**). De même, l'expression d' $\alpha$ -SMA est induite (**Figure 48.G-H**).



**Figure 48 : Effets de la surexpression de miR-199-5p et miR-199a-3p dans la lignée LX-2.** (A) Les cellules LX-2 sont transfectées par des prémiR 199a-5p et 199a-3p ou un prémiR négatif. (B-C) Expression des microARN après transfection de chaque prémiR. Les données sont normalisées par rapport à *RNU44* ; (D) Expression par RT-qPCR du collagène (*COL1A1*). Les données sont normalisées par rapport à *PPIA* ; (E) Dosage colorimétrique du collagène au rouge sirius (Sircol®) ; (F) Expression de la fibronectine (*FN1*) par RT-qPCR. Les données sont normalisées par rapport à *PPIA* ; (G) Expression par Western Blot d' $\alpha$ -SMA. La  $\beta$ -actine est utilisée comme contrôle ; (H) Analyse par immunofluorescence de l' $\alpha$ -SMA (vert) et de la phalloïdine (rouge). n=3 transfections indépendantes et n=2 transfections indépendantes pour l'immunofluorescence ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\* : p < 0,001 ; \*\*\*\* : p < 0,0001 ; # : p < 0,05. Neg = négatif

#### 4. Effets de la perte de fonction de chacun des microARN

Les cellules LX-2 sont transfectées par des oligonucléotides anti-sens de type LNA (Locked-Nucleic Acid) dirigés contre chacun des microARN à une concentration de 10 nM. 48 h après transfection, les cellules sont stimulées pendant 24 h par du TGF- $\beta$  à 10 ng/mL (**Figure 49.A**). Dans un premier temps, nous avons validé l'inhibition de chacun des microARN (miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p) après transfection par les LNA (**Figure 49.B-D**). De manière intéressante, seule l'utilisation d'un oligonucléotide ciblant miR-199a-5p et miR-214-3p est associée à une diminution du phénotype fibrotique, comme l'indiquent l'expression génique de constituants de la MEC, notamment du collagène et de la fibronectine (**Figure 49.E-F**) et l'expression d' $\alpha$ -SMA évaluée par Western Blot et par immunofluorescence (**Figure 49.G-H**). En revanche, ce phénotype n'est pas modifié après transfection par un LNA ciblant miR-199a-3p.

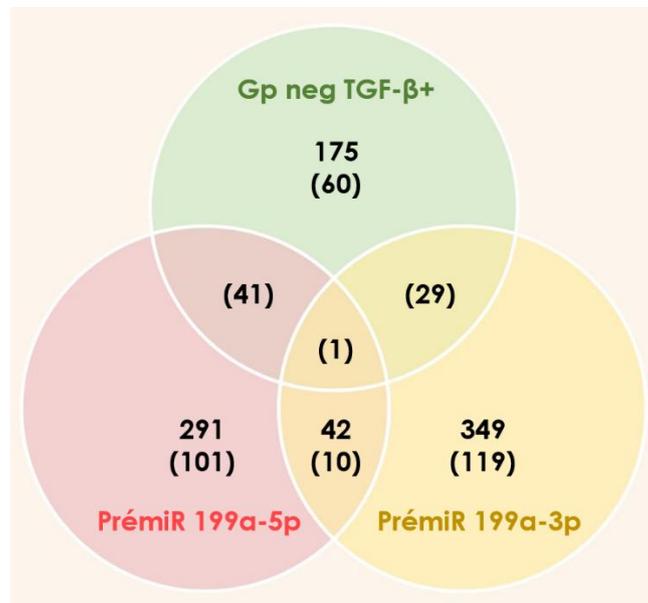


**Figure 49 : Effets de l'inhibition de miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p dans la lignée LX-2.** (A) Les cellules sont transfectées par un anti-miR dirigé contre chacun des microARN puis exposées au TGF-β ; (B-D) Expression des microARN par RT-qPCR. *RNU44* a été utilisé comme gène de ménage ; (E) Expression par RT-qPCR du collagène de type 1 (*COL1A1*) ; (F) Expression de la fibronectine (*FN1*) par RT-qPCR. *PPIA* a été utilisé comme gène de ménage. ; (G) Expression d'α-SMA par Western Blot ; (H) Expression de l'α-SMA par immunofluorescence (n=2). n=3 transfections indépendantes ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; # : p < 0,05.

#### IV. Modèle cellulaire – Analyse RNA-seq

Le séquençage des ARN (RNAseq) des cellules transfectées par chacun des prémiR (miR-199a-5p et miR-199a-3p) ainsi que par un GapmeR dirigé contre DNMT3OS en présence de TGF- $\beta$  a été réalisé.

L'effet du TGF- $\beta$  sur la lignée LX-2 module significativement 175 gènes dont 60 sont des cibles prédites des miR-199a-5p et miR-199a-3p d'après les logiciels TargetScan et miRONTOP (avec un fold change compris entre  $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$  ; adjusted p-value  $< 10^{-6}$ ). La surexpression de miR 199a-5p module significativement l'expression de 291 gènes ( $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$  ; adjusted p-value  $< 10^{-6}$ ). Parmi eux, 101 sont prédits comme étant des cibles de miR-199a-5p dont 41 sont communs à la dérégulation par le TGF- $\beta$ . La surexpression de miR 199a-3p induit la modulation significative de 349 gènes ( $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$  ; adjusted p-value  $< 10^{-6}$ ). Parmi eux, 119 sont des cibles prédites de miR-199a-3p dont 29 sont communes avec l'effet du TGF- $\beta$  (Figure 50).



**Figure 50 : Le traitement par les prémiR 199a-5p, 199a-3p ou le TGF- $\beta$  module l'expression de gènes dans la lignée LX-2.** Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes dérégulés dans les cellules LX-2 transfectées avec chacun des prémiR ou exposées au TGF- $\beta$ . On retrouve entre parenthèse, les gènes dérégulés qui sont des cibles prédites de chacun des microARN miR-199a-5p et miR-199a-3p ( $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$  ; adjusted p-value  $< 10^{-6}$ ).

## 1. Effets du TGF-β

Le traitement des cellules par le TGF-β module l'expression de 175 gènes dont 49 sont sous-exprimés et 126 sont sur-exprimés (adjusted p-value < 10<sup>-6</sup> ; -2 > log2 ou log2 > +2) (Tableau 16).

**Tableau 16 : Liste des gènes modulés par le TGF-β dans la lignée humaine de cellules stellaires LX-2.** Dégradé de vert = sous-exprimés ; dégradé de jaune - rouge = sur-exprimés (adjusted p<10<sup>-6</sup> ; -2 > log2 ou log2 > +2).

Gene symbol	log2 (Gp neg_TGF/Gp neg)	Gene symbol	log2 (Gp neg_TGF/Gp neg)	Gene symbol	log2 (Gp neg_TGF/Gp neg)
SH2D2A	7,50	NEDD9	2,55	KRTAP2-3	-2,12
LPAR5	6,90	INAVA	2,54	NFIB	-2,13
ISLR2	6,78	PDE4C	2,54	PDE1C	-2,14
PMEPA1	6,57	NPY4R2	2,52	LAMA3	-2,14
PRG4	6,27	AMIGO2	2,52	MYPN	-2,19
FOXS1	6,20	INHBA	2,50	NGFR	-2,19
CGB8	5,45	ACTBL2	2,49	METTL7B	-2,21
KANK4	5,41	JUNB	2,47	TXK	-2,21
EGR2	5,22	SORCS2	2,45	ERBB3	-2,22
ODAPH	5,21	SIK1	2,45	PTX3	-2,26
IGLON5	5,18	RASGRP1	2,45	PLCL1	-2,27
GAL	4,81	TSPAN2	2,45	PLCXD3	-2,34
LPAR6	4,52	SERPINE2	2,44	MGARP	-2,34
MYCT1	4,36	BHLHE40	2,44	DKK1	-2,35
DSP	4,30	CLDN4	2,43	PSG1	-2,37
COL15A1	4,18	ANGPTL4	2,42	NANOS1	-2,43
WNT7A	4,17	MYO10	2,42	COL4A6	-2,45
GPR17	4,13	BGN	2,41	RAB7B	-2,46
ST14	4,09	SMAD7	2,41	BMPER	-2,50
ABCA4	4,05	SULF2	2,38	NRG2	-2,50
CGB7	4,00	JAG1	2,37	METTL7A	-2,52
SGCA	3,82	XYLT1	2,37	CDK15	-2,55
LRRC15	3,79	NES	2,33	SERPINB2	-2,55
CPN2	3,68	FBLN5	2,33	RIPOR3	-2,55
LIF	3,57	THBS1	2,32	SECTM1	-2,62
C15orf48	3,51	HS3ST3B1	2,24	GRIN2A	-2,68
FAP	3,34	FSTL3	2,23	CAVIN2	-2,72
SYN1	3,33	HTR1D	2,23	BMP4	-2,74
LTBP2	3,32	SERPINE1	2,22	SEMA3B	-2,75
PLEKHG4B	3,26	CACNA1C	2,22	SH3TC2	-2,78
CRLF1	3,26	CNTN1	2,20	PLEKHA7	-2,82
FN1	3,25	IL6	2,18	SEMA3A	-2,86
KIF26B	3,22	CALB2	2,17	KIT	-2,93
SLAMF8	3,22	HR	2,16	LRRC26	-3,04

IL11	3,19	COL27A1	2,16	SLC27A2	-3,28
LMCD1	3,19	BDKRB2	2,16	PLEKHG4	-3,30
SGCD	3,18	GDNF	2,15	RTL3	-3,52
SNAI1	3,16	CDH11	2,14	EVI2A	-3,67
SERPINA9	3,15	HSF2BP	2,13	PPL	-3,68
TGFB2	3,14	COL4A1	2,13	LRRC7	-3,85
STRA6	3,11	PODXL	2,13	EVI2B	-3,88
HES1	3,10	ANXA8	2,11	PLEKHA7	-2,82
CSF1R	3,02	PALM2-AKAP2	2,10	EDNRB	-2,83
MYOM3	2,99	MMP2	2,10	SEMA3A	-2,86
CCM2L	2,98	SORBS2	2,10	KIT	-2,93
PKNOX2	2,98	VCAN	2,08	LRRC26	-3,04
CDH6	2,97	NREP	2,08	WNT10A	-3,07
MICALCL	2,97	CTGF	2,06	SLC27A2	-3,28
TCIM	2,94	SEMA7A	2,06	PLEKHG4	-3,30
EDN1	2,89	DACT1	2,05	RTL3	-3,52
POU4F2	2,88	IGFBP3	2,04	EVI2A	-3,67
P2RY6	2,85	FBXO32	2,03	PPL	-3,68
PI16	2,81	OPCML	2,03	LRRC7	-3,85
ITGB6	2,80	VDR	2,03	EVI2B	-3,88
VEGFA	2,79	SOX4	2,02		
LOC105377022	2,78	KDM6B	2,02		
TMEM88	2,73	GADD45B	2,02		
ACKR3	2,72	NUAK1	2,01		
MSC	2,69	TNS1	2,00		
TGFBI	2,66	RIPOR2	-2,04		
UNC5B	2,66	PPP2R2B	-2,05		
PTHLH	2,65	FAXDC2	-2,07		
DGKI	2,65	CITED2	-2,08		
TINAGL1	2,63	SMIM10	-2,08		
WNT9A	2,60	MBP	-2,09		
LRRC32	2,59	SIM1	-2,11		
PDGFB	2,58	TMEM71	-2,12		

Gp neg = GampeR contrôle ; TGF = TGF-β

## 2. Effets de la surexpression des miARN miR-199a-5p et miR-199a-3p

La transfection des cellules par le pré-miR 199a-5p module l'expression de 291 gènes (avec une adjusted p-value  $< 10^{-6}$  ;  $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$ ). En prenant des critères statistiques plus drastiques ( $\log_2$  compris entre  $-3 > \log_2$  - ou  $\log_2 > +3$ ), seuls 16 gènes sont sur-exprimés et 32 gènes sous-exprimés. Par ailleurs, la transfection des cellules par le pré-miR 199a-3p module l'expression de 349 gènes (avec adjusted p-value  $< 10^{-6}$  ;  $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$ ) dont 35 gènes sont sur-exprimés et 28 gènes sont sous-exprimés avec un ratio en  $\log_2$  compris entre  $-3 > \log_2$  ou  $\log_2 > +3$  (**Tableau 17**). En particulier, les gènes *SERPINE2* (ratio en  $\log_2 = -3,19$ ) et

*MMP2* (ratio en log2 = -3,84) sont sous-exprimés après transfection par le prémiR-199a-3p, ainsi que le gène *MAP3K11* après transfection par le prémiR-199a-5p (ratio en log2 = -3,07).

**Tableau 17 : Liste des gènes modulés par les prémiR-199a-5p et prémiR-199a-3p dans la lignée humaine de cellules stellaires LX-2.** Dégradé de vert = sous-exprimés ; dégradé de jaune - rouge = sur-exprimés (adjusted p-value < 10<sup>-6</sup> ; -3 > log2 ou log2 > +3).

Gene symbol	log2 (199a3p/ctrl)	log2 (199a5p/ctrl)	Gene symbol	log2 (199a3p/ctrl)	log2 (199a5p/ctrl)	Gene symbol	log2 (199a3p/ctrl)	log2 (199a5p/ctrl)
MAGT1	-3,48	-0,32	E2F5	-3,29	0,15	KLHL3	-1,16	-3,01
CD151	-3,45	-0,55	SHISA3	4,12	1,38	KRTAP4-12	2,15	4,78
NACC1	-3,59	0,76	GPAT3	-3,00	0,22	LRRC29	-1,14	-3,38
VAMP3	-3,74	0,02	RSPO3	5,08	-1,98	CFAP54	-1,63	-3,60
NID1	3,76	3,57	CEACAM1	3,79	-0,83	B3GALT5	-1,54	-3,96
GNA12	-3,27	0,60	DNAH3	3,73	1,72	ALOXE3	1,77	-4,68
NACC2	-3,35	0,43	RGS18	4,70	-2,40	NKAIN1	2,69	4,89
ABCA1	-3,47	0,00	SERPINC1	4,03	1,90	CD22	-1,16	-5,10
ITPK1	-3,11	0,37	CRLF2	3,04	-2,67	SLCO2A1	3,07	4,50
HMOX1	3,81	1,24	TNFSF15	-3,34	-0,83	FNDC5	2,16	5,20
SESN3	-3,57	-2,68	C2orf48	3,61	2,82	TDO2	3,90	5,28
NEGR1	4,21	1,54	PITX3	5,29	3,70	COL11A1	1,08	-3,01
SERTAD4	3,03	1,12	EREG	3,00	0,50	C3orf80	1,61	3,01
GALNT7	-3,85	-1,30	VSTM1	6,22	2,08	KRTAP2-1	1,94	3,50
SCG2	-3,87	-0,31	C11orf96	-3,56	-0,16	KRT17	2,17	3,50
RNF14	-3,09	-0,01	SORL1	-3,43	-2,38	KRT3	-0,53	3,33
SERPINE2	-3,19	2,01	PPFIA2	3,47	1,76	KRTAP2-3	1,68	3,29
RGS7BP	3,91	0,48	RAB38	3,37	0,14	CASC1	-2,16	-3,69
FAM180A	4,53	0,25	CSF2	-3,21	1,48	CHST4	-0,78	-4,10
NXP3	3,73	1,01	MYRIP	3,26	1,23	RGPD2	2,57	4,53
TTBK1	5,19	-0,96	MAP3K11	-1,21	-3,07	FER1L5	-0,48	-3,03
C1QTNF2	3,05	1,54	SLC25A23	-0,08	-4,10	CST1	-2,70	-4,18
MMP2	-3,84	-1,39	ECE1	-1,10	-3,02	WDR63	-1,41	-3,13
PRRX1	4,67	0,89	TAF9B	0,08	-3,08	PPL	-1,91	-4,17
CORO1A	3,75	1,36	NUDT15	2,42	3,14	MYEOV	-1,26	-3,38
SLCO2B1	-3,08	-2,36	EDEM2	-0,14	-3,38	INSC	0,01	-4,57
SLC1A3	3,60	1,96	ORAI3	-0,82	-3,29	ADAP1	3,44	1,50
KLHL4	-3,13	-1,82	IL31RA	-2,38	-3,12	HSPA6	4,02	3,10
IFI44	3,10	-1,54	CFAP57	-0,54	-3,85	MATN3	-4,38	0,43
FAT2	4,10	-1,19	CD163L1	0,92	-3,33	IL13RA2	4,63	-2,20
C11orf87	3,07	0,74	ANK3	-0,54	-3,01	DNAH7	-3,38	-3,67
PTPRG	-4,20	-1,26	SPTLC3	0,05	-3,13	LAMA4	1,41	-3,02
BCL2A1	3,25	-0,82	GCNT2	-2,05	-3,29	EPPK1	-0,85	4,31
TTC29	-3,43	-3,81	ACKR3	-0,49	3,29	GPR4	3,07	-1,32
LRRIQ1	-3,23	-2,43	MYCT1	2,34	-3,64	TM7SF2	-3,29	-1,58
MC5R	4,41	1,36	PKD1L2	-1,71	-4,76			

Ctrl = prémiR contrôle ; 199a5p = miR-199a-5p ; 199a3p = miR-199a-3p

L'annotation des gènes significativement modulés par les deux microARN miR-199a-5p et miR-199a-3p se réfère particulièrement aux voies de signalisation liées à la fibrose hépatique et pulmonaire, à la voie de signalisation du TGF- $\beta$  ou encore aux voies impliquées dans la réparation tissulaire (**Tableau 18**).

**Tableau 18 : Liste des voies canoniques dérégulées par les miR-199a-5p et miR-199a-3p.** Les données, issues du logiciel IPA (Ingenuity Pathway Analysis), sont exprimées en p-value (-log10).

Canonical pathway	miR-199a-3p	miR-199a-5p
Molecular Mechanisms of Cancer	12,88	9,95
Pulmonary Fibrosis Idiopathic Signaling Pathway	8,12	14,04
Cardiac Hypertrophy Signaling (Enhanced)	8,03	6,73
Axonal Guidance Signaling	5,27	7,99
Hepatic Fibrosis Signaling Pathway	6,78	5,47
Ephrin Receptor Signaling	3,68	7,79
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	4,39	7,05
STAT3 Pathway	6,12	5,13
CLEAR Signaling Pathway	4,46	6,20
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	4,47	5,75
Osteoarthritis Pathway	5,12	5,10
HMGB1 Signaling	3,81	5,89
PI3K/AKT Signaling	7,60	2,00
p53 Signaling	6,99	2,46
Integrin Signaling	3,96	5,44
ERK5 Signaling	3,41	5,65
Neuroinflammation Signaling Pathway	5,20	3,64
Tumor Microenvironment Pathway	3,64	5,19
TGF- $\beta$ Signaling	2,19	6,56
G-Protein Coupled Receptor Signaling	5,23	3,46
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	5,65	2,83
Wound Healing Signaling Pathway	2,60	5,87
Epithelial Adherens Junction Signaling	2,81	5,59
IL-8 Signaling	5,62	2,77
Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	2,92	5,00
Cyclins and Cell Cycle Regulation	6,53	1,01
Estrogen-mediated S-phase Entry	5,44	1,71
RANK Signaling in Osteoclasts	5,29	0,83

Ces données sont en accord avec les données disponibles relatives à la dérégulation de l'expression des miR-199a-5p et miR-199a-3p dans certaines maladies (et fonctions biologiques) (ratio en log2 compris en  $-2 > \log_2$  et  $\log_2 > +2$ ), notamment dans la tumorigenèse, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire ou encore l'invasion (**Tableau 19**).

**Tableau 19 : Liste des maladies et fonctions biologiques pour lesquelles une dérégulation de l'expression des miR-199a-5p et miR-199a-3p est observée.** Dégradé de bleu = sous-exprimés et dégradé d'orange = sur-exprimé.  $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$ ).

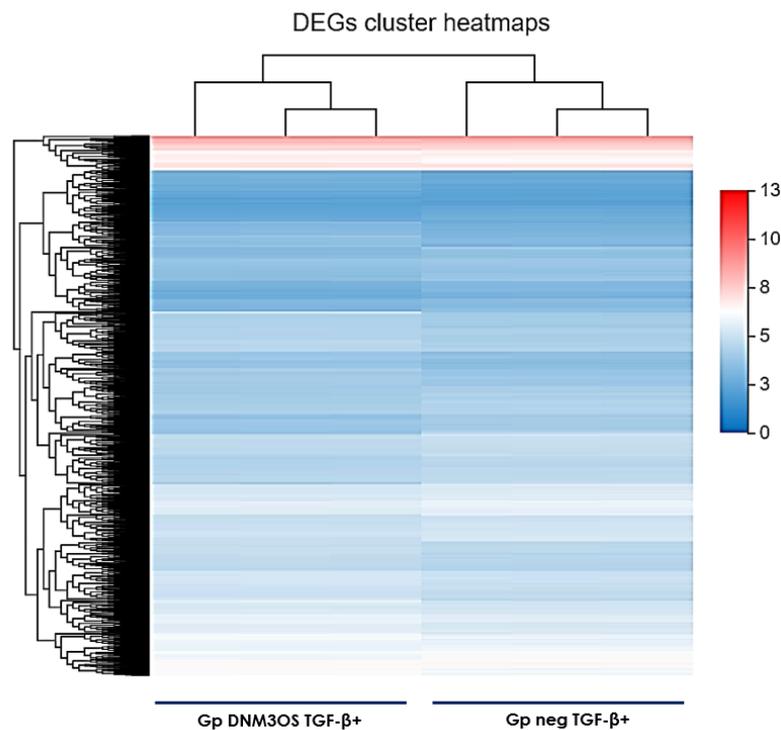
Diseases and Bio Functions (z-scores)	miR-199a-3p GOF	miR-199a-5p GOF
Viral Infection	-4,27	-0,40
Liver cancer	2,27	1,82
Cell death of epithelial cells	2,75	0,83
Liver tumor	2,46	1,10
Growth of epithelial tissue	2,36	0,97
Liver lesion	3,18	0,14
Liver carcinoma	2,20	1,09
Hepatobiliary neoplasm	2,21	0,99
Cell-cell contact	-2,09	-1,02
Accumulation of cells	-2,36	-0,61
Necrosis of epithelial tissue	2,47	0,44
Immune mediated inflammatory disease	2,14	-0,55
Development of body axis	-2,48	-0,13
Apoptosis of epithelial cells	2,54	N/A
Organismal death	2,33	-0,20
Morbidity or mortality	2,24	-0,25
Proliferation of hepatocytes	2,42	N/A
Development of head	-2,26	-0,15
Growth of liver	2,31	N/A
Proliferation of liver cells	2,19	N/A
Leukocyte migration	0,34	-3,19
Sprouting	1,17	2,14
Bladder tumor	1,07	2,22
Cell movement of leukocytes	0,01	-3,22
Muscle tumor	-0,72	2,20
Blue round small cell tumor	0,00	2,77
Cardiogenesis	-0,02	2,74

Benign lesion	0,68	2,06
Proliferation of neuronal cells	0,58	2,04
Extracranial solid tumor	0,12	2,47
Growth of muscle tissue	0,08	2,37
Proliferation of muscle cells	0,02	2,37
Multiple cancers	0,03	2,02
Invasion of cells	-0,03	2,02

GOF = Gain Of Function

### 3. Effets de l'inhibition de DNMT3OS ± TGF-β

Sous l'effet du TGF-β, le traitement de la lignée LX-2 par le GapmeR dirigé contre DNMT3OS induit la sur-expression de 49 gènes et la sous-expression de 29 gènes, de manière significative (avec adjusted p-value < 10<sup>-6</sup> ; -2 > log2 ou log2 > +2) (**Figure 51**).



**Figure 51** : Sous l'effet du TGF-β, le traitement de la lignée LX-2 par le GapmeR dirigé contre DNMT3OS module l'expression de gènes. Heatmap représentant la modulation de gènes sous l'effet du GapmeR DNMT3OS, en présence de TGF-β.

Le **Tableau 20** indique le ratio en log2 ( $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$ ) de gènes significativement dérégulés par le GapmeR DNM3OS avec et sans TGF- $\beta$  par rapport à la condition GapmR neg (avec adjusted p-value  $< 10^{-6}$  ;  $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$ ). L'inhibition de DNM3OS dans la lignée LX-2 induit la sur-expression de gènes anti-fibrotiques tels que *BMP6* ainsi que les gènes des métalloprotéinases MMP-1 et MMP-3, à la fois dans les LX-2 activées par le TGF- $\beta$  ou non.

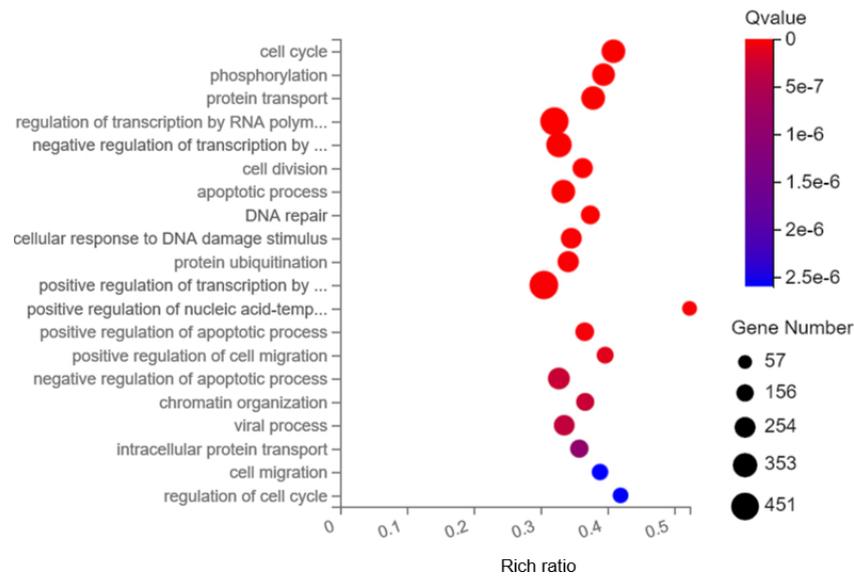
**Tableau 20 : Liste des gènes modulés dans la lignée humaine de cellules stellaires (LX-2) après transfection des cellules LX-2 par un GapmeR dirigé contre DNM3OS.** Dégradé de vert = gènes sous-exprimés ; dégradé de rouge = gènes sur-exprimés avec une adjusted p-value  $< 10^{-6}$  et un ratio en log2 compris entre  $-2 > \log_2$  ou  $\log_2 > +2$ .

Gene Symbol	log2 Gp DNM3OS / Gp neg	log2 Gp DNM3OS_TGF/Gp neg_TGF	Gene Symbol	log2 Gp DNM3OS / Gp neg	log2 Gp DNM3OS_TGF/Gp neg_TGF
ADRA2C	1,94	2,14	LOC107984862	3,52	2,69
ALOXE3	2,32	2,01	LOC107985524	2,73	2,62
ANGPTL4	3,02	2,87	LOC389602	2,06	1,59
ANK3	-1,99	-2,36	LRRC15	-1,42	-2,42
ARHGAP30	-2,33	-1,05	LRRC32	-1,34	-2,46
ATF6	-2,43	-2,50	LRRC7	-2,05	0,82
B3GALT5	2,68	3,02	MAPK13	2,17	2,05
BATF2	1,67	2,04	METTL7A	-2,37	-1,55
BCL2A1	2,68	1,97	MMP1	3,34	3,88
BEST1	2,79	2,51	MMP24-AS1-		
BMP6	1,99	3,03	EDEM2	2,86	2,01
C3orf52	-2,04	-2,24	MMP3	3,33	5,49
CAMK1G	2,24	1,53	NARF	-3,19	-3,01
CD22	2,82	4,78	NGFR	1,31	2,21
CDH13	-2,80	-2,79	NKAIN1	3,22	1,55
CLDN4	-0,61	-2,57	PADI1	1,66	2,97
CNTN1	-1,59	-2,19	PAPPA	1,49	2,01
COL11A1	-3,17	-2,73	PLCB1	-2,23	-2,60
COL25A1	-3,78	-3,80	PLEKHG4B	2,46	1,68
CREB3L2	-2,04	-2,16	PPL	-2,32	-0,95
CTSE	2,86	2,18	PRKCA	-3,37	-3,38
DRGX	2,71	3,32	PRKCE	1,13	2,04
EDIL3	-2,02	-1,84	PRLR	2,61	2,26
ELF3	-2,03	-1,73	PRR16	-3,59	-3,12
ENOX2	-2,37	-2,28	PRR9	5,50	5,42
FAR2	-2,89	-2,77	PSG2	2,42	2,47
FAT3	-2,48	-1,74	PSG7	2,38	3,62
FTO	-2,20	-2,25	PTK2B	-2,41	-2,82
GABBR2	2,86	2,12	RARRES2	-2,22	-1,69
GDF15	2,03	1,27	RGS4	0,62	2,50
GOLGA7B	1,59	2,24	RIPOR2	-2,00	-1,12
			RRAD	-1,18	-2,08

GPC6	-2,38	-2,64	SCG5	2,41	2,05
GRIN2A	-2,83	-1,76	SCMH1	-1,97	-2,23
HDAC9	1,63	2,03	SEC23A	-2,54	-2,73
HKDC1	3,08	3,37	SERPINB7	2,22	2,61
HSPA6	2,61	2,52	SH3TC2	0,86	2,11
IL1RL1	2,51	4,38	SHISA2	0,46	2,04
ITGB2	2,57	3,07	SLC18A3	1,38	2,84
IVL	3,77	4,08	SLC3A2	2,26	1,97
KIAA0513	-1,94	-2,05	SLCO3A1	-3,09	-3,20
KIAA1755	2,78	2,26	SLITRK6	2,13	3,19
KITLG	1,47	2,05	SOX5	-3,73	-4,29
KLHDC7B	2,32	2,13	SYN1	2,02	0,71
KRT15	2,59	3,78	TENM1	-3,31	-2,34
KRT3	4,72	3,44	TM4SF19	2,39	2,35
KRT34	2,82	3,60	TMEM117	-1,77	-2,13
KRT79	2,90	2,14	TMEM156	2,45	1,07
KRTAP2-1	2,41	3,67	TRPM2	2,17	2,31
KRTAP2-3	2,36	3,89	TSGA10IP	2,23	2,11
KRTAP4-8	3,75	6,32	TSPAN15	-2,78	-2,80
KRTAP4-9	2,76	4,12	TTC17	-2,02	-1,86
LAMB3	2,13	1,81	VPS13B	-3,61	-3,23
LOC100653049	2,23	2,86	VWF	-2,16	-0,87
LOC107984282	2,37	2,52			

Gp DNM3OS = GapmeR DNM3OS ; Gp neg = GapmeR contrôle ; TGF = TGF- $\beta$ .

L'annotation des gènes (selon les termes GO) indique que les gènes modulés par le traitement par un GapmeR dirigé contre DNM3OS sont associés à différents processus biologiques notamment le cycle cellulaire, la migration, l'apoptose, le transport de protéines ... (**Figure 52**).



**Figure 52 : Analyse “Gene Ontology” (GO) des gènes modulés par le GapmeR DNM3OS en présence de TGF- $\beta$ .** La taille des ronds est corrélée au nombre de gènes dérégulés ; le dégradé de couleur correspond à la q-value (p-value ajustée), du moins significatif (bleu) au plus significatif (rouge) ; Le « rich ratio » correspond au nombre de gènes enrichis pour chaque fonction biologique par rapport au nombre de gènes total.

Une analyse complémentaire réalisée à l’aide d’Ingenuity Pathway Analysis (IPA) montre que le GapmeR dirigé contre DNM3OS en présence de TGF- $\beta$  induit notamment la modulation de gènes impliqués dans les voies de signalisations PI3K/AKT, Wnt/ $\beta$ -caténine, la voie du TGF- $\beta$  ou encore au niveau du cytosquelette d’actine (**Figure 53**).

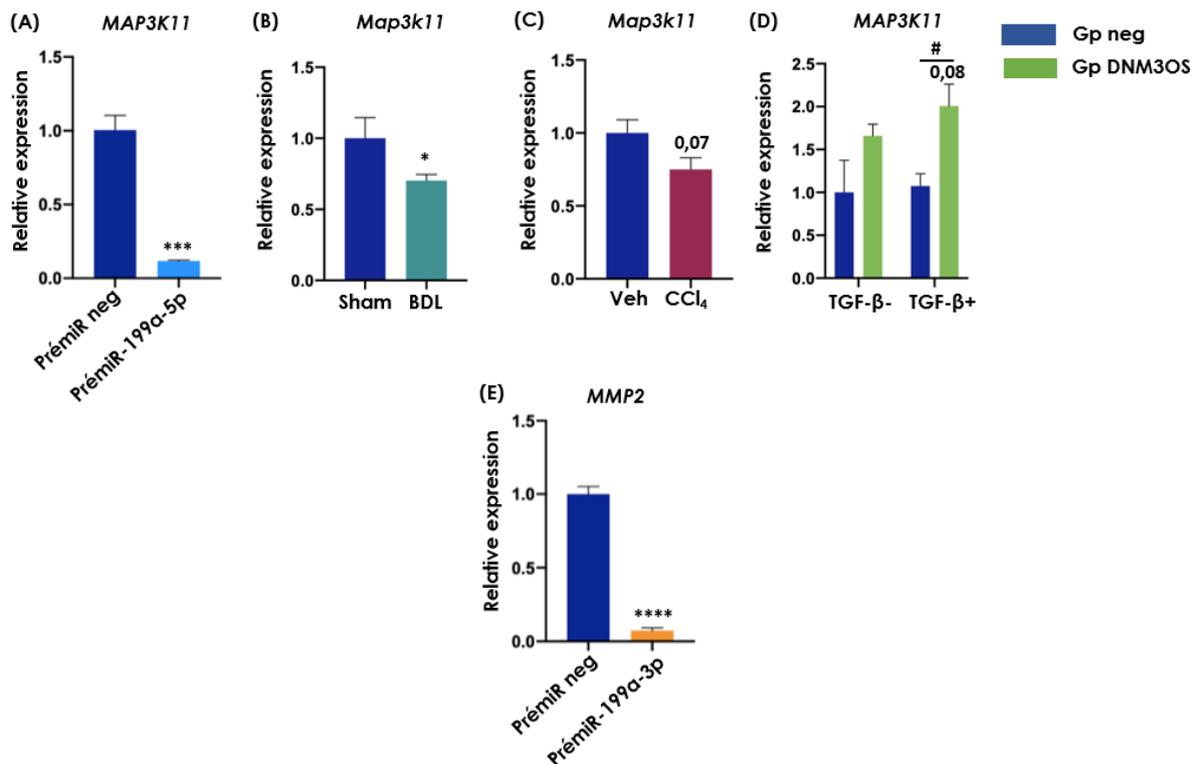


**Figure 53 : Voies de signalisation dérégulées sous l'effet du GpmeR dirigé contre DNM3OS en présence de TGF- $\beta$ .** L'effet du GpmeR dirigé contre DNM3OS en présence de TGF- $\beta$  dans la lignée LX-2 sur les voies de signalisation est représenté par un z-score (score standard correspondant à l'écart type par rapport à la moyenne). Les voies significativement réprimées sont représentées par un dégradé de bleu tandis que les voies les plus significativement activées sont représentées par un dégradé d'orange. Gp neg = GpmeR contrôle ; Gp DNM3OS = GpmeR DNM3OS ; TGF = TGF- $\beta$ .

#### 4. Cibles potentielles des miR-199a-5p et miR-199a-3p : études préliminaires

A partir des données issues du séquençage, nous avons sélectionné, parmi l'ensemble des gènes dérégulés, le gène *MAP3K11* comme cible potentielle de miR-199a-5p. De manière intéressante, la transfection des cellules LX-2 par le prémiR-199a-5p induit une inhibition de *MAP3K11* (**Figure 54.A**). De manière cohérente, cet effet est inversé lorsque DN3OS est inhibé dans les cellules LX-2 (**Figure 54.D**). Ces premières données sont confirmées *in vivo* dans les modèles murins par obstruction des voies biliaires et par administration de  $\text{CCl}_4$  (**Figure 54.B-C**).

De même, en ce qui concerne *MMP2*, une cible potentielle de miR-199a-3p, les premières données indiquent que la transfection des cellules LX-2 par le prémiR-199a-3p induit l'inhibition significative de ce gène (**Figure 54.E**).



**Figure 54 : Etude préliminaire de deux cibles potentielles des miR-199a-5p et miR-199a-3p.** (A) Expression de *MAP3K11* par RT-qPCR dans les cellules LX-2 transfectées avec le prémiR-199a-5p ; (B-C) Expression par RT-qPCR de *Map3k11* dans le modèle murin par obstruction des voies biliaires (BDL) et dans le modèle murin d'administration de  $\text{CCl}_4$  ; (D) Expression par RT-qPCR de *MAP3K11* dans la lignée LX-2 transfectées avec le Gp DN3OS et exposées au TGF- $\beta$  ; (E) Expression par RT-qPCR de *MMP2* dans les cellules LX-2 transfectées avec le prémiR-199a-3p. *PPIA* (*Ppia*) a été utilisé comme gène de ménage. n = 3 expérimentations indépendantes pour les cellules LX-2 ; n=3 souris Sham , n=6 souris BDL, n=5 souris véhicule, n=5 souris  $\text{CCl}_4$  ; \* : p < 0,05 ; # : p < 0,05. BDL = Obstruction des voies biliaires ; Veh = véhicule ;  $\text{CCl}_4$  = tétrachlorométhane ; Gp = GapmeR ; neg = négatif.

## E. Discussion

De manière générale, les lncARN sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (mécanismes épigénétiques, régulations post-transcriptionnelle et traductionnelle). La dérégulation de leur expression étant associée au développement de pathologies (Zhang *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2018; Ai and Yu, 2019; Savary *et al.*, 2019a), ils représentent ainsi des cibles thérapeutiques prometteuses. Ainsi, quelques études concernant l'impact de leur inhibition par des oligonucléotides anti-sens (ASO) de type GapmeR ont commencé à émerger ces dernières années (Viereck *et al.*, 2016; Amodio *et al.*, 2018). Les GapmeR ont la particularité d'exercer leur action au niveau nucléaire en formant un duplex ADN / ARN avec leur gène cible, permettant ainsi le recrutement de la RNase H nucléaire endogène et la dégradation du transcrit primaire (Asami *et al.*, 2021). Par conséquent, dans le cadre des ARN non codant polycistroniques, ce type de molécules est susceptible d'inhiber simultanément l'ensemble des microARN du cluster. Cette stratégie a déjà montré des effets bénéfiques dans le cadre du myélome multiple en ciblant le long ARN non codant MIR17HG (miR-17~92), transcrit primaire de six miARN matures (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-19a-1 (Morelli *et al.*, 2018).

De manière intéressante, de par leur structure et leurs modifications chimiques, les ASO sont très affins pour leur cible et sont résistants aux nucléases, permettant d'envisager leur utilisation en clinique (Wan and Seth, 2016). Ces modifications chimiques peuvent avoir lieu au niveau des bases (Gupta *et al.*, 2021), du ribose (2'-OMe ou de type LNA (Bennet *et al.*, 2000) ou encore au niveau de la liaison phosphodiester (modification phosphorothioate (Eckstein, 2000)). Les GapmeR présentent également des propriétés pertinentes d'un point de vue clinique (Geary *et al.*, 2015; Shadid, Badawi and Abulrob, 2021). En effet, ils sont solubles en solution saline, présentent une biodisponibilité importante, notamment dans le foie et les reins et ne passent pas la barrière hémato-encéphalique (Koller *et al.*, 2011; Geary *et al.*, 2015; Bennett *et al.*, 2017). De plus, ils peuvent atteindre leur cible rapidement (de quelques minutes à quelques heures) et leur temps de demi-vie est relativement long (Shen and Corey, 2018). L'utilisation de GapmeR dirigés contre des longs ARN non codants a déjà montré des effets bénéfiques dans le cadre de plusieurs pathologies. A titre d'exemple, l'inhibition de MALAT1, un lncARN dont la sur-expression est associée à la croissance tumorale et à un pronostic défavorable chez des patients atteints de cancers (Zhang *et al.*, 2015), s'est révélée

efficace dans des modèles pré-cliniques de cancers humains (Amodio *et al.*, 2018). De plus, dans un modèle murin de sténose cardiaque, le ciblage du lncARN Chast permet de limiter les signes d'hypertrophie cardiaque (Viereck *et al.*, 2016). De manière intéressante, des ASO de types GapmeR permettant de réguler l'épissage ont d'ores et déjà obtenu une AMM notamment dans la myopathie de Duchenne et dans l'amyotrophie spinale (Mendell *et al.*, 2016; Finkel *et al.*, 2017).

Nos travaux antérieurs ont récemment montré que l'administration d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre DNM3OS, transcrit primaire de trois miARN miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p permet de prévenir et d'atténuer les lésions de fibrose dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Savary *et al.*, 2019a). Par ailleurs, la contribution de miR-214-3p dans la différenciation des Progéniteurs Fibro-Adipogéniques (FAP) a été démontré dans le contexte de la myopathie de Duchenne (**Annexe 3 – Page 218**).

**Annexe 3 :**

Arrighi N, Moratal C, Savary G, Fassy J, Nottet N, Pons N, Clément N, **Fellah S**, Larrue R, Magnone V, Lebrigand K, Pottier N, Dechesne C, Vassaux G, Dani C, Peraldi P, Mari B.

**The Fibromir miR-214-3p is upregulated in Duchenne Muscular Dystrophy and promotes differentiation of human fibro-adipogenic muscle progenitors.** *Cells*. 2021 ; 10 : 1832.

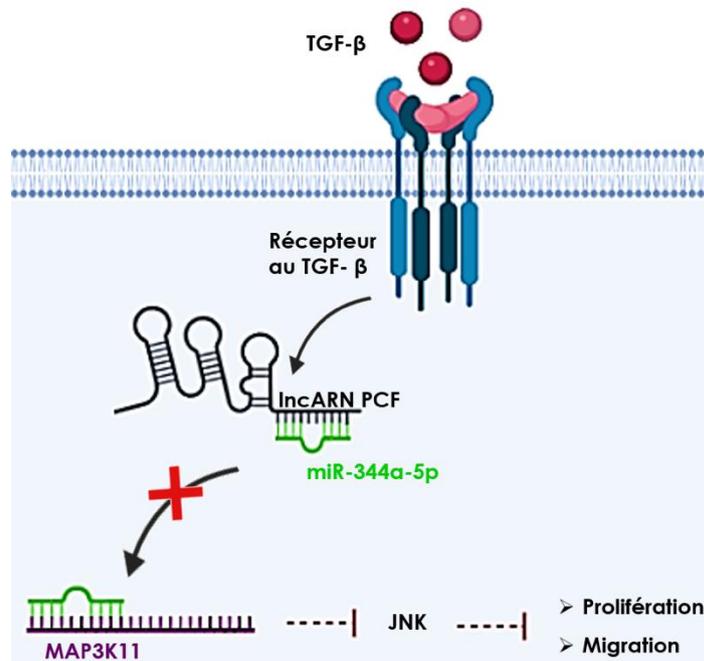
Le processus de fibrose étant indépendant de l'organe touché, nous avons souhaité étendre ces travaux à la fibrose hépatique. D'origine diverse et encore largement débattue, les myofibroblastes hépatiques dérivent principalement des cellules mésenchymateuses résidentes, en particulier des cellules stellaires hépatiques (HSC) et des cellules mésenchymateuses portales (Mallat and Lotersztajn, 2009). Le rôle pro-fibrotique de DNM3OS a donc été appréhendé dans un premier temps dans deux modèles murins de fibrose hépatique impliquant les HSC (administration par injection intrapéritonéale de CCl<sub>4</sub>) ou les cellules mésenchymateuses portales (ligature du canal biliaire, BDL) (Campana and Iredale, 2017). Le modèle BDL induit en quelques jours des lésions de fibrose massives et, par

conséquent, est pertinent pour les phases de mises au point. Par ailleurs, le modèle par injections de CCl<sub>4</sub>, quant à lui, est plus représentatif des agressions chroniques du foie (Yanguas *et al.*, 2016). En premier lieu, nous avons observé dans les deux modèles murins utilisés, que DNMT3A et les trois microARN miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p sont surexprimés dans les foies des souris présentant des lésions de fibrose. De plus, l'inhibition de DNMT3A en curatif dans le modèle CCl<sub>4</sub> est associée à l'atténuation des lésions de fibrose. Bien que ces premiers résultats obtenus soient intéressants, des travaux complémentaires sont nécessaires. En particulier, nous souhaitons évaluer la biodisponibilité du GapmeR au niveau hépatique en réalisant un tri cellulaire à partir d'échantillons tissulaires issus de souris ayant reçu une molécule marquée (Cyanine 5 – Cy5). Un séquençage des ARN sur cellules uniques (single-cell RNAseq) pourra permettre d'identifier l'impact de l'inhibition de DNMT3A dans chacun des types cellulaires dans lesquels il est exprimé.

La faible conservation des longs ARN non codants entre les espèces reste cependant une limite à leur ciblage clinique. En effet, les lncARN sont très peu conservés (Li and Liu, 2019; Robinson, Covarrubias and Carpenter, 2020). Les miARN présentant un degré de conservation plus élevé, il pourrait être plus pertinent d'adopter une stratégie thérapeutique visant à moduler l'expression d'un seul microARN du cluster si l'un d'entre eux exerce un effet majeur. Ainsi, notre équipe a montré que l'inhibition seule de miR-199a-5p permet d'atténuer significativement les lésions de fibrose dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, de manière similaire à l'inhibition de DNMT3A (Savary *et al.*, 2019a). Il apparaît donc essentiel d'identifier la contribution de chacun des miARN issus de DNMT3A dans le phénotype observé. De plus, il est maintenant clairement établi que les microARN ciblent de nombreux ARNm (Lu and Rothenberg, 2018). Il est donc nécessaire d'éclaircir le rôle de chacun des miARN du cluster de DNMT3A dans la fibrose hépatique et d'identifier les cibles de ces miRNA qui peuvent varier en fonction du type cellulaire ou du contexte pathologique. Ainsi, dans le cadre de la fibrose pulmonaire, miR-199a-5p intervient dans la voie de signalisation canonique et non-canonique du TGF- $\beta$  en ciblant notamment la cavéoline-1, un constituant des cavéoles, responsable de la dégradation des récepteurs au TGF- $\beta$ . De plus, miR-214-3p intervient dans la régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine en ciblant GSK-3 $\beta$ . MiR-199a-3p, quant à lui, interviendrait dans la réparation épithéliale en ciblant HGF et FGF7 (Savary *et al.*, 2019a; Savary *et al.*, 2019b).

L'étude des mécanismes associés à chacun des microARN (miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p) ainsi qu'à DNM3OS a ainsi été réalisée dans une lignée immortalisée humaine de cellules stellaires, les cellules LX-2 (Higashi, Friedman and Hoshida, 2017), grâce à des études de perte et de gain de fonction. Nous avons dans un premier temps confirmé que la stimulation des cellules LX-2 par le TGF- $\beta$  induit l'apparition d'un phénotype myofibroblastique. Ce phénotype est également observé suite à la surexpression de miR-199a-5p, contrairement à celle de miR-199a-3p. En revanche, la transfection de plusieurs précurseurs de miR-214-3p à des concentrations variables est associée à une cytotoxicité importante et ne nous a pas permis d'obtenir des données exploitables jusqu'à présent. A l'inverse, l'utilisation d'un GapmeR dirigé contre DNM3OS et des anti-miR (LNA) dirigés contre chacun des microARN entraîne une diminution du phénotype fibrotique, en particulier dans les cellules activées par le TGF- $\beta$ . Le séquençage des ARN (RNAseq) des cellules LX-2 transfectées par le GapmeR dirigé contre DNM3OS et exposées au TGF- $\beta$  ou par chacun des prémiR (prémiR-199a-5p et prémiR-199a-3p) a été réalisé. L'analyse des gènes les plus significativement dérégulés et prédits comme étant des cibles potentielles de miR-199a-5p et de miR-199a-3p a permis de sélectionner quelques gènes connus pour être impliqués dans le processus de fibrose, en particulier *MAP3K11* et *MMP2* respectivement.

Le rôle de *MAP3K11*, un régulateur positif de la voie de signalisation JNK, dans le processus de fibrose pulmonaire a déjà été évoqué (Liu *et al.*, 2017a). En effet, Liu *et al.*, (2017) ont montré que le TGF- $\beta$  induit la surexpression du lncARN PCF qui agit en tant qu'éponge du microARN miR-344a-5p, un miARN ciblant directement *MAP3K11*, favorisant ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales pulmonaires ainsi que la prolifération des myofibroblastes activés (**Figure 55**).



**Figure 55 : Mécanisme de régulation de la voie JNK par miR-344a-5p dans la fibrose pulmonaire.** La fixation de TGF- $\beta$  sur son récepteur entraîne l'inhibition de miR-344a-5p par le lncARN PCF. Ainsi, miR-344a-5p ne peut plus inhiber son gène cible *MAP3K11*, induisant l'activation de la voie JNK et entraînant la prolifération et la migration cellulaire.

Nos premiers résultats montrent une diminution significative de l'expression de *MAP3K11* par RT-qPCR dans les cellules LX-2 transfectées par le pré-miR-199a-5p. De plus, nous observons une diminution de *Map3k11* dans les deux modèles murins (BDL et CCl<sub>4</sub>). Ces premières données nécessitent d'être confirmées à la fois dans le modèle CCl<sub>4</sub> avec le GapmeR dirigé contre DN30S et dans les cellules LX-2 transfectées avec le LNA 199a-5p où on s'attend à observer une augmentation de *MAP3K11*. Ces résultats devront être confortés à la fois par l'utilisation d'un siARN dirigé contre *MAP3K11* dans la lignée LX-2 et par mutagenèse dirigée.

L'implication de MMP-2 dans le processus de fibrogenèse a été démontrée dans plusieurs études. En effet, la sécrétion de collagène de type 1 par les HSC au cours du processus de fibrogenèse entraîne la sécrétion de MMP-2 afin de favoriser le remodelage de la MEC (Préaux *et al.*, 1999; Théret *et al.*, 1999). Ainsi, l'expression de *Mmp2* augmente au cours de la fibrose hépatique et diminue progressivement au fur et à mesure de la résolution des lésions dans des modèles de rongeurs (Kossakowska *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2004; Bansal *et al.*, 2005). De même, l'expression de *MMP2* est induite chez des patients atteints de maladies chroniques du foie (Préaux *et al.*, 1999). En particulier, Théret (2001) ont montré que l'activité de MMP- 2

est associée au stade de fibrose et est plus élevée dans les échantillons d'hépatocarcinomes présentant une cirrhose sous-jacente. Bien que *MMP2* soit une cible prédite de miR-199a-3p d'après les logiciels Targetscan et miRONTOP, nos premières données indiquent que la transfection des cellules LX-2 par un précurseur de miR-199a-3p est associée à une diminution de l'expression de *MMP2*. Il est donc nécessaire d'explorer de nouvelles pistes concernant le rôle de miR-199a-3p. De manière intéressante, une étude a montré que miR-199a-3p est sur-exprimé chez des patients atteints de fibrose hépatique. La sur-expression de FXR (Farnesoid X Receptor) inhibe miR-199a-3p qui ne peut plus inhiber sa cible LKB1 (Liver Kinase B1). L'inhibition de miR-199a-3p par FXR est alors associée à une diminution du stress oxydant et à une meilleure survie des hépatocytes (Lee *et al.*, 2012). Une autre étude a montré que miR-199a-3p participerait au processus de fibrose hépatique, et plus particulièrement dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , en régulant l'expression de la cavéoline-2 (Yang *et al.*, 2020).

Au total, l'ensemble de nos travaux suggère que DNM3OS, notamment en tant que réservoir de trois miARN, joue un rôle majeur dans le développement de la fibrose hépatique. De plus l'administration d'un oligonucléotide anti-sens de type GapmeR dirigé contre DNM3OS dans le modèle murin de fibrose hépatique semble prometteuse et permet d'envisager la pertinence clinique de l'inhibition de DNM3OS pour les patients atteints de fibrose hépatique.

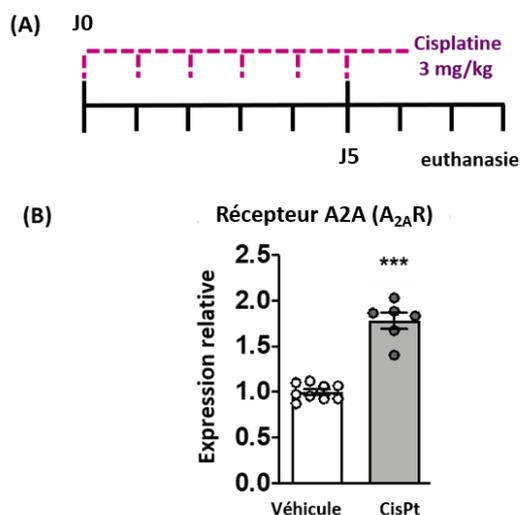
**Chapitre 2 :**  
**L'istradefylline (KW6002), un antagoniste sélectif du**  
**récepteur A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R), limite les effets toxiques du**  
**cisplatine tout en préservant ses propriétés anti-**  
**tumorales**

---

## I. Contexte

Le cancer du poumon, en particulier le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) qui représente près de 85 % des cancers du poumon, est l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde (Hoy, Lynch and Beck, 2019). Un tiers des patients atteints de NSCLC présente une tumeur localement avancée ne pouvant être réséquée chirurgicalement. De plus, bien que les progrès de la génomique des tumeurs aient révolutionné la prise en charge des patients à l'aide de thérapies ciblées plus efficaces que les chimiothérapies conventionnelles, seul un nombre limité de patients peut bénéficier de ces nouvelles thérapies (Nasim, Sabath and Eapen, 2019). Ainsi, pour la majorité des patients, l'utilisation d'une chimiothérapie cytotoxique à base de sels de platine, dont le traitement de référence reste le cisplatine, est privilégiée (Socinski *et al.*, 2013). Cependant, l'utilisation du Cisplatine reste en partie limitée en raison des effets indésirables graves que cette molécule peut induire. En particulier, on observe des effets néphrotoxiques qui s'expriment principalement par une nécrose tubulaire et une insuffisance rénale aiguë chez environ 30% des patients (Hamroun *et al.*, 2019). Des lésions de fibrose interstitielle peuvent également s'installer chez certains patients (Budu *et al.*, 2021). Malgré la mise en place de traitements néphroprotecteurs (tels que l'hyperhydratation ou l'éviction d'autres médicaments néphrotoxiques), la prévalence de la toxicité rénale chez les patients recevant du cisplatine reste élevée (Hayati *et al.*, 2015). De plus, l'utilisation du cisplatine est associée à l'apparition d'autres effets indésirables, dont en particulier, chez 30 à 40% des patients, une neuropathie sensorielle (neuropathie périphérique) qui se manifeste par une hypersensibilité (paresthésie) des membres (Staff *et al.*, 2017). L'ensemble de ces effets toxiques peut ainsi conduire à limiter les doses de cisplatine, voire à modifier le traitement, générant de ce fait un risque péjoratif d'évolution de la pathologie tumorale. Par conséquent, il est primordial de développer de nouvelles approches permettant de limiter significativement la néphrotoxicité et la neurotoxicité du cisplatine afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer, en particulier de NSCLC.

De manière intéressante, des travaux préliminaires réalisés au laboratoire ont permis d'observer par sérendipité dans un modèle murin que l'administration de cisplatine induit une surexpression du récepteur A<sub>2A</sub>R (**Figure 56**).



**Figure 56 : L'administration de Cisplatine induit une sur-expression du récepteur A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R).** (A) Des souris ont reçu une injection de Cisplatine à une dose de 3 mg/kg pendant 6 jours. Les souris « contrôles » (véhicule) ont reçu une solution saline ; (B) Expression par RT-qPCR de A<sub>2A</sub>R. *Ppia* est utilisé comme gène de référence. n=6-16 souris par groupe. \*\*\* : p < 0,001. Cisplatine : cisplatine.

Ces premières données nous ont ainsi conduits à appréhender le rôle de l'adénosine et de ses récepteurs dans la toxicité induite par le cisplatine.

## II. L'adénosine et ses récepteurs

### 1. Adénosine

L'adénosine est un nucléoside composé d'une molécule d'adénine liée à un ribose (Fredholm *et al.*, 2001) (**Figure 57**). Elle est constitutive des acides nucléiques et ribonucléiques tels que l'ATP (adénosine triphosphate) (Faulds, Chrisp and Buckley, 1991). De par sa distribution ubiquitaire, elle régule de nombreux processus physiologiques, notamment au niveau des systèmes nerveux central et périphérique (Liu *et al.*, 2019b; Coppi *et al.*, 2022), cardiovasculaire (Reiss *et al.*, 2019) et immunitaire (Antonioli *et al.*, 2019).

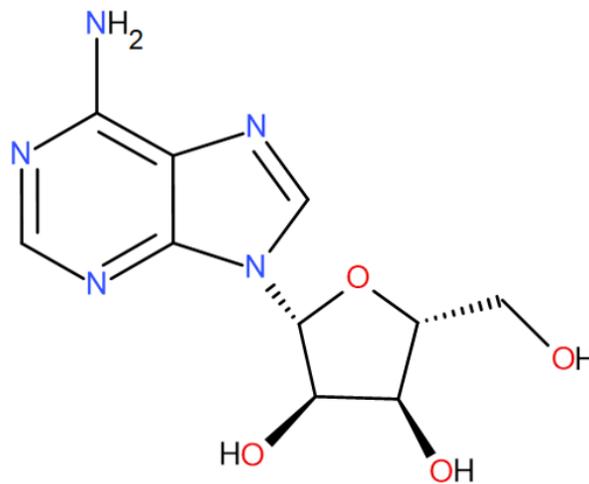
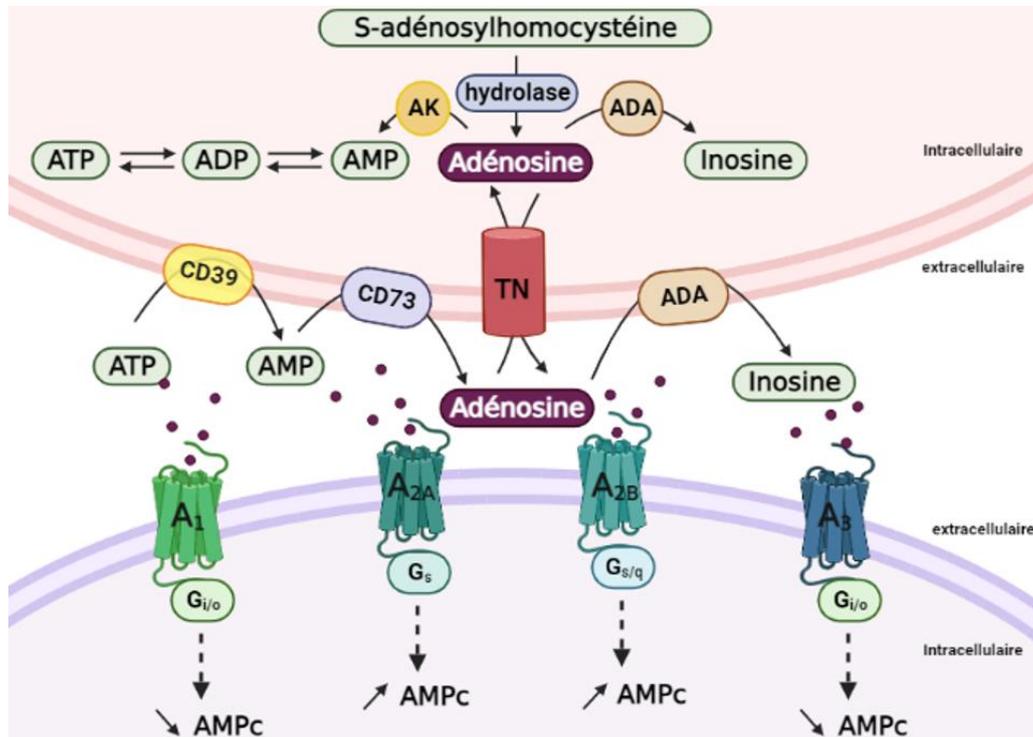


Figure 57 : Structure de l'adénosine

L'adénosine est produite à la fois au niveau intracellulaire et extracellulaire. A l'état physiologique, la concentration extracellulaire d'adénosine est faible, généralement comprise entre 20 et 300 nM (Newby, 1984; Antonioli *et al.*, 2008). En conditions pathologiques, sous l'effet de divers stimuli (infection, microenvironnement tumoral, inflammation, greffe), la concentration extracellulaire d'adénosine augmente fortement (de l'ordre du micromolaire) en raison d'une consommation accrue d'ATP (Newby, 1984; Borea *et al.*, 2018). En effet, l'ATP est dégradée par des enzymes de surfaces CD39 (ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase) et CD73 (5'-nucléotidase) respectivement en AMP puis en Adénosine. L'adénosine ainsi produite est recaptée au niveau intracellulaire grâce aux transporteurs membranaires CNT (transporteurs de nucléosides concentrateurs, SLC28) et ENT (transporteurs de nucléosides équilibrateurs, SLC29) (Young *et al.*, 2013). L'adénosine ainsi

recaptée est soit phosphorylée par une adénosine kinase en AMP, soit subit une réaction de désamination la convertissant en inosine par une adénosine désaminase (Zhou, Schneider and Blackburn, 2009; Sachdeva and Gupta, 2013; Dou *et al.*, 2018) (**Figure 58**).



**Figure 58 : Métabolisme de l'adénosine.** En condition normale, l'adénosine est principalement produite par l'hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (SAH) par la SAH hydrolase. Sous l'effet de divers stimuli, l'adénosine est produite au niveau extracellulaire par des déphosphorylations successives de l'ATP puis de l'AMP par respectivement l'ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase CD39 et par l'ecto-5'-nucléotidase CD73. L'adénosine ainsi produite pourra alors se fixer sur ses quatre récepteurs afin de stimuler ou inhiber la production d'AMP cyclique (AMPC). L'adénosine peut également être recaptée en intracellulaire par un transporteur nucléosidique (TN). L'adénosine peut produire de l'AMP, ADP et ATP par une adénosine kinase (AK) ou subir une désamination produisant ainsi de l'inosine par une adénosine déaminase (ADA).

Une dérégulation de la production d'adénosine est à l'origine de conséquences pathologiques (Borea *et al.*, 2018; Dou *et al.*, 2018), notamment dans la douleur (Adebiyi *et al.*, 2019), le cancer (Boison and Yegutkin, 2019), l'ischémie-reperfusion (Zimmerman *et al.*, 2013) ou encore les maladies neurodégénératives (Chang *et al.*, 2021) et auto-immunes (Magni and Ceruti, 2020).

## 2. Récepteurs à l'adénosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R)

### a. Généralités

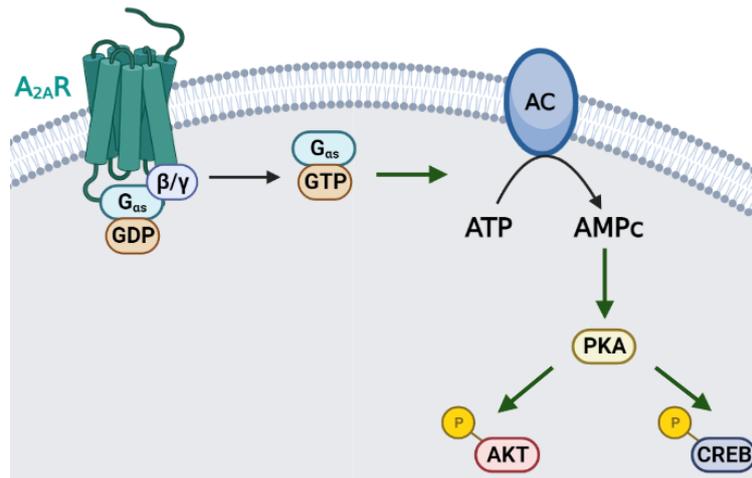
L'adénosine exerce ses effets biologiques en se liant à des récepteurs purinergiques (ou purino-récepteurs). Ces récepteurs, décrits en 1978 par Burnstock et al., sont couplés à une protéine G et sont constitués de 7 domaines transmembranaires. Deux types de récepteurs purinergiques présentant des rôles pharmacologiques différents ont été identifiés. Il s'agit d'une part des récepteurs P<sub>1</sub> dont l'adénosine est un ligand, et d'autre part, des récepteurs P<sub>2</sub> qui reconnaissent notamment l'AMP, l'ADP, l'ATP, l'UDP et l'UTP comme ligands (Burnstock, 1978; Ralevic and Burnstock, 1991).

Parmi les récepteurs de type P<sub>1</sub>, il existe 4 sous-types de récepteurs à l'adénosine : A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub> (Fredholm *et al.*, 2001) (**Figure 58**). La fixation de l'adénosine (ou de ses agonistes) sur ses récepteurs module l'activité de l'adénylate-cyclase selon le type de protéine G couplée au récepteur. Les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub> (protéine G de type G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>) entraînent l'inhibition de l'adénylate cyclase, tandis que les récepteurs A<sub>2A</sub> et A<sub>2B</sub> (protéine G de type G<sub>s</sub>) l'activent induisant ainsi une accumulation intracellulaire d'AMPc (AMP cyclique) (**Figure 58**) (Londos, Cooper and Wolff, 1980; Fredholm *et al.*, 2001; Sachdeva and Gupta, 2013). Bien que ces récepteurs aient le même ligand, leur distribution tissulaire, leur niveau d'expression, leur affinité pour le ligand et la nature des protéines G induisent ainsi des réponses cellulaires différentes (Sheth *et al.*, 2014).

### b. Récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R)

Au niveau mécanistique, la fixation d'adénosine sur A<sub>2A</sub>R active l'adénylate cyclase entraînant la production d'AMPc. L'AMPc permet d'activer la PKA (Protéine Kinase A) qui phosphoryle CREB (AMPc Responsive Element Binding) et AKT (ou protéine kinase B) (Borea *et al.*, 2018) (**Figure 59**), induisant ainsi deux voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et la prolifération cellulaire (Arasi, Shahrestanaki and Aghaei, 2019).

Au niveau mécanistique, la fixation d'adénosine sur A<sub>2A</sub>R active l'adénylate cyclase entraînant la production d'AMPc puis l'activation de deux voies de signalisation, CREB (AMPc Responsive Element Binding) et AKT (ou protéine kinase B) (Borea *et al.*, 2018), impliquées dans l'apoptose et la prolifération cellulaire (Arasi, Shahrestanaki and Aghaei, 2019) (**Figure 59**).



**Figure 59 : Le récepteur A<sub>2A</sub>.** La fixation d'adénosine (ou d'un agoniste) sur le récepteur A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R) active l'adénylate cyclase (AC) entraînant la production d'AMP cyclique (AMPC). La production d'AMPC induit l'activation de la protéine kinase A (PKA) à l'origine de la phosphorylation de CREB (AMPc Responsive Element-Binding) et de AKT (Protéine Kinase B).

La distribution du récepteur A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R) est ubiquitaire (Fredholm *et al.*, 2001). Il est notamment exprimé au niveau du système nerveux central et des tissus périphériques tels que le foie, le cœur, les poumons et le système immunitaire (Dixon *et al.*, 1996).

Dans le système nerveux central, le récepteur A<sub>2A</sub>R régule l'activité motrice, le comportement, le sommeil et la mort cellulaire des neurones en modulant le relargage de neurotransmetteurs (glutamate, acétylcholine, Acide gamma-aminobutyrique GABA, noradrénaline) au niveau pré-synaptique (Fredholm *et al.*, 2011; Wei, Li and Chen, 2011; Sheth *et al.*, 2014). De plus, dans le cadre de la maladie de Parkinson, A<sub>2A</sub>R étant co-localisé avec le récepteur dopaminergique-D2 (D2R), sous forme d'hétérodimère, son antagonisme entraîne une augmentation de l'affinité de D2R pour son agoniste et augmente l'activité locomotrice, ouvrant ainsi la voie à une nouvelle piste thérapeutique (Ferre *et al.*, 1991; Fuxe *et al.*, 2003).

Au niveau périphérique, A<sub>2A</sub>R joue un rôle spécifique en fonction de l'organe et du type cellulaire dans lesquels il est exprimé. Par exemple, il permet de réguler la pression sanguine et le rythme cardiaque (Abebe and Mustafa, 2002; Schindler *et al.*, 2005; Headrick *et al.*, 2013). Une étude récente a également montré que le récepteur A<sub>2A</sub>R joue un rôle anti-inflammatoire au niveau pulmonaire chez des patients infectés par la COVID-19 (DiNicolantonio and Barroso-Aranda, 2020). En effet, sa stimulation par un agoniste inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et inflammatoires

(neutrophiles, éosinophiles, monocytes et mastocytes) (Jazayeri, Andrews and Marshall, 2017). Le récepteur A<sub>2A</sub>R participe également au processus de cancérogenèse. En effet, une concentration importante d'adénosine est présente dans le micro-environnement tumoral (Ohta *et al.*, 2006; Sitkovsky *et al.*, 2014). De plus, la surexpression d'A<sub>2A</sub>R dans les cellules cancéreuses favoriserait la croissance tumorale (Young *et al.*, 2016). A<sub>2A</sub>R joue également un rôle dans les néphropathies. En effet, sa stimulation permet de limiter les lésions de fibrose rénale (Garcia *et al.*, 2011). De plus, Awad *et al.*, ont montré dans un modèle d'ischémie-reperfusion que la stimulation d'A<sub>2A</sub>R par un agoniste, diminue l'infiltration de macrophage et par conséquent atténue le développement de lésions de fibrose tubulo-interstitielle et de nécrose glomérulaire (Awad *et al.*, 2006).

Les premières données issues de nos travaux ont permis de montrer que l'administration de Cisplatine induit une sur-expression de A<sub>2A</sub>R dans un modèle murin. Ces résultats nous ont conduits à tester dans ce même modèle, l'effet bénéfique potentiel de la modulation pharmacologique de A<sub>2A</sub>R par l'Istradefylline (KW6002), un antagoniste sélectif de ce récepteur déjà approuvé par la FDA dans la maladie de Parkinson, sur les effets toxiques du cisplatine (néphrotoxicité et neuropathie périphérique). De plus, afin de s'assurer que la modulation de A<sub>2A</sub>R par le KW6002 n'altère pas les propriétés anti-tumorales du Cisplatine, un modèle murin de greffe syngénique a été développé. Les principaux résultats sont résumés ci-dessous. L'ensemble des données obtenues a fait l'objet d'une publication présentée en **Annexe 4 – page 219.**

#### **Annexe 4 :**

Dewaeles E\*, Carvalho K\*, **Fellah S\***, Sim J, Boukrout N, Caillierez C, Ramakrishnan H, Van der Hauwaert C, Vijayashankara J, Martin N, Massri N, Launay A, Folger JK, De Schutter C, Larrue R, Loison I, Goujon M, Jung M, Le Gras S, Gomez-Murcia V, Faivre E, Lemaire J, Garat A, Beauval N, Maboudou P, Gnemmi V, Gibier JB, Buée L, Abbadie C, Glowacki F, Pottier N, Perrais M, Cunha RA, Annicotte JS, Laumet G, Blum D, Cauffiez C.

**Istradefylline (KW6002) protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin anti-tumor effects.** J Clin Invest. 2022 ; 132(22) : e152924.

\* Contribution équivalente

### III. Résultats

#### 1. Le Cisplatine induit des effets néphrotoxiques

Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'administration de cisplatine en aigu (une injection à 10 mg/kg) ou en sub-chronique (3 mg/kg par jour pendant 6 jours) dans un modèle murin, entraîne des effets néphrotoxiques. En effet, nous observons, dans les deux modèles, une augmentation significative de l'urée plasmatique et le développement de lésions rénales (présence de signes de nécrose et de tubules atrophiés. De plus, au niveau moléculaire, nous observons une augmentation significative de l'expression rénale des marqueurs de souffrance NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) et KIM1 (Kidney Injury Molecule-1), des marqueurs inflammatoires TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor – alpha) et IL-6 (Interleukin-6) ainsi que du rapport Bax/Bcl-2, reflet du processus apoptotique (**Figure 1 – Annexe 4**).

De manière intéressante, dans ces mêmes modèles, l'administration de cisplatine induit l'augmentation significative de l'expression rénale d'A<sub>2A</sub>R. De plus, l'expression de ce récepteur est corrélée à l'urée plasmatique et à l'expression rénale de NGAL et KIM-1 (**Figure 2 – Annexe 4**).

#### 2. Le KW6002 permet de limiter la toxicité rénale du cisplatine

La co-administration de Cisplatine (3 mg/kg/jour pendant 6 jours) et de KW6002 (une dose par jour à 3 mg/kg, en préventif 5 jours avant les administrations de Cisplatine et ce pendant 12 jours) limite la toxicité rénale induite par le Cisplatine. En effet, nous observons une diminution significative des marqueurs de souffrance rénale NGAL et KIM1, des marqueurs d'inflammation IL-6 et TNF- $\alpha$  ainsi que de l'urée plasmatique et de l'activité des caspases 3/7, protéines effectrices du processus apoptotique (**Figure 3 – Annexe 4**).

Les analyses transcriptomiques (RNA-seq) réalisées dans ce modèle murin ont permis de montrer que le Cisplatine exerce ses effets néphrotoxiques en affectant différentes voies de signalisation impliquées notamment dans l'oxydo-réduction, le transport, le métabolisme lipidique et l'apoptose, des voies qui sont décrites comme étant impliquées dans les propriétés cytotoxiques du cisplatine (Manohar and Leung, 2018) (**Figure 4 – Annexe 4**). Afin de pouvoir étudier ces différents mécanismes, nous avons alors utilisé une culture primaire immortalisée humaine de cellules tubulaires proximales, la lignée RPTEC/hTERT1. D'une part,

l'exposition des cellules au Cisplatine induit la mort cellulaire par apoptose. D'autre part, la co-administration de KW6002 permet de limiter ce processus, comme en atteste la diminution de l'activité des caspases 3/7 et la diminution du clivage de Parp et de la caspase 3. Parmi les voies suggérées par l'analyse transcriptomique, nous nous sommes focalisés sur le processus d'oxydo-réduction. Le KW6002 permet de limiter la surexpression d'HO-1 (Hème Oxygénase 1) et de Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2), induite par le cisplatine. Des résultats similaires sont observés sur l'activité de la catalase (**Figure 5 – Annexe 4**). En ce qui concerne le métabolisme lipidique, le cisplatine induit une accumulation de lipides à la fois dans les cellules RPTEC/hTERT1 et dans les tissus rénaux du modèle murin d'administration sub-chronique de Cisplatine. L'utilisation du KW6002 permet de réduire significativement cette accumulation lipidique à la fois *in vitro* et *in vivo* (**Figure 5 – Annexe 4**). Enfin, afin d'explorer le transport rénal, nous avons réalisé un dosage de platine à la fois dans le modèle murin et dans la culture primaire RPTEC/hTERT1. Les données obtenues indiquent que l'administration de KW6002 permet de limiter l'accumulation de platine dans les reins des souris et dans les cellules tubulaires proximales. En particulier, l'efflux global des cellules RPTEC/hTERT1 est augmenté en présence de KW6002 (**Figure 8 – Annexe 4**).

### **3. Le KW6002 permet de limiter les effets neurotoxiques**

L'effet du KW6002 sur un autre effet indésirable du cisplatine a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Laumet (Université d'état du Michigan). L'administration répétée de Cisplatine (3 mg/kg/jour pendant 6 jours) induit une hypersensibilité à la douleur et la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et CCL<sub>2</sub>. De plus, la co-administration de KW6002 permet de limiter cette hypersensibilité et réduit la production des cytokines pro-inflammatoires (**Figure 9 – Annexe 4**).

### **4. Le KW6002 limite la néphrotoxicité et la neurotoxicité sans affecter l'efficacité anti-tumorale du cisplatine**

Afin de s'assurer que le KW6002 n'interfère pas avec l'efficacité anti-tumorale du cisplatine, un modèle murin de greffe syngénique a été mis en place. L'induction de tumeurs a été réalisée par l'injection de des cellules d'adénocarcinome pulmonaire murin (LLC1). De manière intéressante, l'antagoniste KW6002 limite les effets néphrotoxiques induits par le cisplatine, tout en préservant ses propriétés anti-tumorales. (**Figure 6 – Annexe 4**). Une analyse

transcriptomique a été réalisée sur les échantillons tumoraux provenant de ce modèle. Les analyses bioinformatiques ont permis de mettre en évidence que le KW6002 exacerbe les effets du cisplatine seul, en particulier sur les voies de la réplication de l'ADN, des dommages à l'ADN, les mécanismes de réparation de l'ADN et le cycle cellulaire. Afin d'explorer ces mécanismes, des cellules d'adénocarcinome pulmonaire murines LLC1 (Lewis Lung Carcinoma 1) et humaines H1975 ont été exposées à une dose de Cisplatine (respectivement 2 et 20  $\mu\text{M}$ ). Les résultats obtenus montrent que le Cisplatine induit la mort cellulaire par apoptose et des dommages à l'ADN dans les deux lignées. En effet, on observe une augmentation du nombre de foyers  $\gamma\text{-H2AX}$  dans les deux lignées exposées au Cisplatine. Comme attendu, le co-traitement des cellules avec le KW6002 n'altère pas les effets anti-tumoraux. De plus, un test des comètes a été réalisé dans la lignée H1975 et confirme l'augmentation des dommages à l'ADN en présence de Cisplatine et de KW6002 comparé au Cisplatine seul (**Figure 7 – Annexe 4**). Enfin, dans la lignée H1975, ainsi que dans les échantillons tumoraux, on observe une accumulation de platine après administration de l'agent anti-cancéreux. De manière intéressante et contrairement aux données observées au niveau rénal, l'accumulation de platine est conservée en présence de KW6002 et est associée à la diminution de l'efflux global des cellules cancéreuses (**Figure 8 – Annexe 4**).

Enfin, l'ensemble de ces données a été confirmé dans un second modèle murin de greffe syngénique (cellules de carcinome oeso-pharyngé (mEERL)), modèle dans lequel nous avons pu observer que le KW6002 permet de protéger les animaux à la fois des effets neurotoxiques et néphrotoxiques du Cisplatine tout en préservant ses propriétés anti-tumorales, voire même en les potentialisant (**Figure 10 – Annexe 4**).

## IV. Discussion

Malgré la mise en place de moyens de prévention, la néphrotoxicité et la neuropathie périphérique induites par le cisplatine sont des effets indésirables graves qui touchent environ un tiers des patients traités par ce composé (Hayati *et al.*, 2015; Staff *et al.*, 2017; Hamroun *et al.*, 2019). C'est pourquoi l'identification de cibles permettant d'atténuer les effets néphrotoxique et neurotoxique du Cisplatine sans altérer son efficacité anti-tumorale reste un enjeu clinique majeur.

Etant donné que nous avons observé dans un modèle murin de néphrotoxicité induite par le cisplatine que l'expression de A<sub>2A</sub>R est augmentée, nous avons souhaité évaluer en préventif les effets de la modulation pharmacologique de ce récepteur. L'ensemble des données obtenues a permis de confirmer que l'antagoniste sélectif de A<sub>2A</sub>R, KW6002 (Istradefylline), limite à la fois la néphrotoxicité et la neuropathie périphérique, induites par le cisplatine. Le séquençage RNA-seq réalisé a permis d'identifier les voies modulées par le cisplatine seul et en présence de KW6002. L'administration de Cisplatine régule positivement des gènes impliqués dans les voies de l'apoptose, l'inflammation et le stress oxydant et régule négativement des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme lipidique. De manière intéressante, la co-administration de KW6002 avec le Cisplatine permet de limiter cette modulation transcriptomique. Certaines de ces voies ont été évaluées *in vitro* dans une culture primaire immortalisée de cellules tubulaires proximales CTP (RPTEC/hTERT1) et ont permis de confirmer l'effet du KW6002 sur le métabolisme lipidique et le stress oxydatif. D'une part, le métabolisme lipidique est une source importante d'ATP au niveau des tubules rénaux (Xu *et al.*, 2022) et en particulier, la perturbation de l'oxydation des acides gras, à l'origine de l'accumulation lipidiques et des lésions cellulaires, joue un rôle fondamental dans les effets néphrotoxiques du cisplatine (Li *et al.*, 2020). D'autre part, le cisplatine est très réactif vis-à-vis des substances nucléophiles telles que le glutathion (GSH), les cystéines ou les méthionines, qui sont activées en thiols réactifs (Siddik, 2003; Wang and Lippard, 2005). L'accumulation de cisplatine dans les mitochondries des cellules épithéliales tubulaires induit la production de ROS et la diminution de molécules ou protéines antioxydantes dont la catalase ou le glutathion (Zhang *et al.*, 2021), conduisant à l'apoptose des CTP (Pabla and Dong, 2008; Dasari and Tchounwou, 2014). L'effet du KW6002 sur l'équilibre redox rénal est donc particulièrement important et en accord avec les études montrant que les antagonistes

A<sub>2A</sub>R exercent un effet bénéfique sur le stress oxydant (Aires *et al.*, 2019; X. Wang *et al.*, 2022). Enfin, l'effet néphroprotecteur du KW6002 est lié à sa capacité à limiter l'accumulation rénale de platine, en particulier dans les CTP. En particulier, nous avons montré que le KW6002 permettait de restaurer l'activité des pompes d'efflux MATE1 (SLC47A1) et ABCC2 (ATP7B). Bien que les mécanismes de régulation des pompes d'efflux par le KW6002 soient peu décrits dans la littérature, des études ont montré que l'activation de A<sub>2A</sub>R inhibe l'expression et les fonctions de la P-gp induisant ainsi une accumulation de ses substrats (Kim and Bynoe, 2016).

De manière intéressante, le KW6002 permet également de limiter les effets neurotoxiques du Cisplatine sans affecter ses effets anti-tumoraux, comme en attestent les données obtenues dans les modèles de douleur et de greffes syngéniques (LLC1 et mEERL). L'analyse transcriptomique réalisée sur les tumeurs LLC1 indique que l'administration de Cisplatine inhibe des voies moléculaires associées au cancer comme la prolifération cellulaire, la réplication ou encore la réparation de l'ADN. Le KW6002 semble renforcer les propriétés anti-tumorales du Cisplatine en augmentant la sensibilité des cellules cancéreuses, en particulier en exacerbant les dommages à l'ADN induits par le cisplatine. Ces résultats sont en accord avec des études publiées suggérant un effet potentialisateur de la caféine, un antagoniste non-sélectif de A<sub>2A</sub>R, sur les propriétés anti-tumorales du Cisplatine (Kawano *et al.*, 2012; Oda, Hidaka and Suzuki, 2017). De plus, une étude a récemment montré l'intérêt du blocage de A<sub>2A</sub>R par le KW6002 pour limiter les troubles cognitifs induits par le Cisplatine, notamment en réduisant l'anxiété, les troubles de la mémoire et l'apprentissage, sans affecter les effets anti-tumoraux du Cisplatine dans un modèle murin de greffe syngénique avec des cellules du cancer du sein (MCF7) (Oliveros *et al.*, 2022). De même, l'intérêt du ciblage des autres récepteurs à l'adénosine a fait l'objet de quelques études visant à limiter les effets indésirables du Cisplatine. Ainsi, le blocage de A<sub>1</sub>R semble être bénéfique dans des modèles de néphrotoxicité induite par le Cisplatine ou encore la gentamycine chez le rat (Knight *et al.*, 1991; Nagashima, Kusaka and Karasawa, 1995; Gill *et al.*, 2009). Cependant, les effets protecteurs induit par le blocage de A<sub>1</sub>R sont très controversés. En effet, d'autres études ont montré que le ciblage de A<sub>1</sub>R par un antagoniste exacerbe les effets indésirables du Cisplatine, et en particulier l'ototoxicité (Sheth *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'activation du

récepteur A<sub>3</sub> semble limiter, quant à lui, les effets neurotoxiques induits par le Cisplatine (Singh *et al.*, 2022).

L'ensemble de nos résultats démontre ainsi l'efficacité du KW6002 à limiter les effets néphrotoxiques et neurotoxiques du Cisplatine, sans atténuer ses propriétés anti-tumorales. Déjà autorisée par la FDA dans la maladie de Parkinson (Chen and Cunha, 2020), le KW6002 pourrait à la fois réduire les effets délétères du Cisplatine mais également améliorer ses propriétés anti-tumorales. Après consolidation des résultats dans le cadre d'un essai clinique, l'utilisation du KW6002 pourrait être particulièrement intéressante, dans le cadre d'un repositionnement de molécule, pour limiter les effets secondaires liés au Cisplatine.

## **Discussion générale et perspectives**

---

Au cours de sa vie, l'Homme est exposé à des millions de xénobiotiques, tels que les polluants environnementaux (pesticides, perturbateurs endocriniens ...), les médicaments, ou encore les additifs alimentaires (Idle and Gonzalez, 2007; Johnson *et al.*, 2012). Les xénobiotiques sont néfastes pour l'organisme et bien qu'une grande majorité de ces composés soient métabolisés afin d'être éliminés, certains métabolites formés sont plus toxiques et entraînent des effets indésirables voire des pathologies graves (Testa and Krämer, 2007; Manikandan and Nagini, 2018). Ainsi en 2012, l'OMS a estimé que la pollution environnementale (pollution de l'air, de l'eau et des sols) était responsable de plus de 12 millions de décès dans le monde (*Preventing disease through healthy environments: a global assessment of the burden of disease from environmental risks*, 2016). De même, la consommation de médicaments peut conduire à l'apparition d'effets indésirables chez certains patients. Par définition (selon l'article R. 5121-153 du code de santé publique), un effet indésirable est « une réaction nocive et non voulue à un médicament, se produisant aux posologies normalement utilisées chez l'homme pour la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement d'une maladie ou pour la restauration, la correction ou la modification d'une fonction physiologique, ou résultant d'un mésusage du médicament ou produit ». En France, l'étude prospective IATROSTAT réalisée par les Centres Régionaux de la Pharmacovigilances a estimé qu'en 2018 plus de 210 000 hospitalisations par an étaient liées aux effets indésirables des médicaments. Parmi les 610 médicaments impliqués dans l'apparition d'effets indésirables, 20% sont des anti-néoplasiques (<https://www.rfcrpv.fr/etude-iatrostat/>). En particulier le Cisplatine, très largement utilisé dans le traitement des cancers solides (poumon, testicules, ovaires, gastrique, ...), est à l'origine d'effets secondaires variés, dont des effets néphrotoxiques chez plus d'un tiers des patients et ce, malgré la mise en place de moyens de prévention (Hamroun *et al.*, 2019). Par ailleurs, certains médicaments peuvent également entraîner des lésions au niveau hépatique (Aithal *et al.*, 2011), regroupées sous le terme « DILI » pour « Drug-Induced Liver Disease ». En Europe et aux Etats-Unis, les DILI se manifestent majoritairement par des insuffisances hépatiques aiguës (Russo *et al.*, 2006; Reuben, Koch and Lee, 2010; Björnsson and Björnsson, 2022) et sont responsables de 15% des transplantations hépatiques aux Etats-Unis (Russo *et al.*, 2004). Les DILI sont plus fréquemment induits par le paracétamol qui conduit à une nécrose hépatocellulaire (Ramachandran and Jaeschke, 2018; Saccomano, 2019; Björnsson and Björnsson, 2022) et par l'amiodarone ou le méthotrexate qui induisent une fibrose

hépatique voire une cirrhose, d'autant plus sévère que le patient présente un désordre métabolique (Huang *et al.*, 2019; Bafna *et al.*, 2021; Björnsson and Björnsson, 2022).

C'est dans ce contexte que se sont inscrits mes travaux de thèse, au cours desquels j'ai pu évaluer les effets de deux stratégies visant à limiter (i) le développement de lésions de fibrose hépatique initiées chimiquement et (ii) les effets néphrotoxiques induits par le Cisplatine.

## **I. Evaluation des effets de l'inhibition du long ARN non codant DNM3OS sur les lésions de fibrose hépatique**

La fibrose hépatique représente un problème de santé publique majeur. A un stade avancé, la fibrose conduit à la cirrhose et, dans 5 à 30% des cas, à un hépatocarcinome (HCC) (Moon *et al.*, 2019). La cirrhose est la 11<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde (Asrani *et al.*, 2019) et la 5<sup>ème</sup> en Europe centrale (Marcellin and Kutala, 2018). De plus, 90% des HCC, qui représentent la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde (Konyn, Ahmed and Kim, 2021), présentent une composante fibrotique (Baglieri, Brenner and Kisseleva, 2019). A l'heure actuelle, aucun traitement spécifique n'est disponible et la meilleure stratégie thérapeutique reste l'élimination ou le traitement de la cause (Lee, Wallace and Friedman, 2015; Altamirano-Barrera, Barranco-Fragoso and Méndez-Sánchez, 2017; Schuppan *et al.*, 2018)

Ainsi, mes travaux de thèse ont permis de démontrer le rôle pro-fibrotique du long ARN non codant DNM3OS en utilisant deux modèles murins de fibrose hépatique, l'un par obstruction des voies biliaires et l'autre par administration de CCl<sub>4</sub>. De plus, l'inhibition de DNM3OS et des trois miARN du cluster (miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p) à l'aide d'un ASO de type GapmeR se traduit par une réduction des lésions de fibrose induites par l'administration répétée de CCl<sub>4</sub>. Afin de confirmer ces premiers résultats et d'obtenir une preuve de concept solide, d'autres modèles murins pourraient être utilisés. En particulier, le modèle par obstruction des voies biliaires qui permet de mimer les agressions cholestatiques, notamment la cholestase ou encore la cirrhose biliaire primitive (Liedtke *et al.*, 2013) pourrait être un modèle pertinent étant donné que nous avons déjà observé une augmentation de l'expression de DNM3OS six jours après la chirurgie. De plus, ces travaux pourront être poursuivis dans un

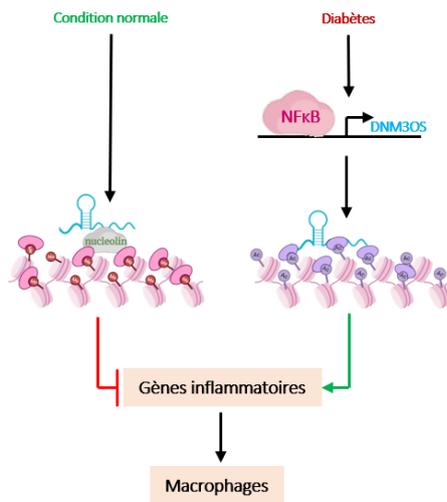
modèle murin de cirrhose, présentant des lésions de fibrose plus importantes. Ainsi, deux modèles, mimant des stades de cirrhose différents, peuvent être utilisés, l'un présentant une cirrhose précoce grâce à l'administration de CCl<sub>4</sub> deux fois par semaine pendant 8 semaines, l'autre mimant une cirrhose partiellement réversible grâce à l'administration de CCl<sub>4</sub> pendant 12 semaines pour une cirrhose partiellement réversible (Constandinou, Henderson and Iredale, 2005; Ravichandra and Schwabe, 2021). Il serait pertinent d'utiliser d'autres modèles tels qu'un modèle de NASH grâce à un régime riche en graisse, un modèle de lésions immunitaire permettant de mimer une infection virale ou encore un modèle d'overdose au paracétamol (Bao *et al.*, 2021).

De plus, une étude de perte et de gain de fonction a été initiée dans une lignée de cellules stellaires (HSC), la lignée LX-2. Ainsi, nous avons montré dans cette lignée que la transfection par un GapmeR dirigé contre DNMT3A est associée à la diminution du phénotype fibrotique induit par le TGF- $\beta$ . Un effet semblable est observé après transfection par un anti-miR dirigé contre miR-199a-5p ou miR-214-3p, contrairement à l'utilisation d'un anti-miR-199a-3p. A l'inverse, la transfection par un précurseur de miR-199a-5p est associée à une exacerbation du phénotype fibrotique. Des résultats préliminaires suggèrent que MAP3K11 pourrait être impliqué dans la régulation du phénotype fibrotique *via* miR-199a-5p. Bien que les HSC soient les cellules majoritairement impliquées dans le processus de fibrose (Mederacke *et al.*, 2013), il pourrait être pertinent de réaliser ce même type d'études dans d'autres types cellulaires précurseurs de myofibroblastes, en particulier dans des fibroblastes portaux (Li *et al.*, 2007). De même, afin de mimer plus finement le processus de fibrose *in vitro*, il serait envisageable de réaliser des co-cultures d'HSC et d'hépatocytes. Cependant, des études ont montré que le contact cellules-cellules entre les HSC et les hépatocytes entraînait la dédifférenciation des hépatocytes (Heslop *et al.*, 2017; van Grunsven, 2017). Diverses approches ont donc été testées afin de s'affranchir de cette limite. L'une d'elles consiste à cultiver les HSC au fond d'un puits et de cultiver les hépatocytes sur un insert afin d'éviter les contacts cellules-cellules tout en maintenant leurs échanges (van Grunsven, 2017). Par ailleurs, afin de mimer l'architecture tri-dimensionnelle de l'organe, il serait également intéressant et pertinent de réaliser une co-culture rassemblant des HSC, des hépatocytes et des cellules de Kupffer dans une matrice. Idéalement, ce modèle 3D pourrait être mis en place dans un système micro-

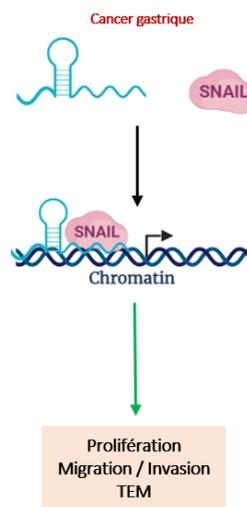
fluidique afin de mimer la pression sanguine (van Grunsven, 2017). Une alternative prometteuse réside dans le développement d'organoïdes hépatiques (Bao *et al.*, 2021).

Une limite de nos travaux réside dans le fait que nous nous sommes uniquement intéressés à DNM3OS en tant que transcrit primaire et réservoir de trois miARN (Fellah *et al.*, 2022). Une fois transcrit par l'ARN polymérase II, le transcrit primaire de DNM3OS peut également être pris en charge par le spliceosome et conduire à la forme mature de ce long ARN non codant nucléaire. Le rôle de ce dernier a ainsi déjà été démontré (i) dans l'acétylation des histones induisant une dérégulation de la réponse inflammatoire dans le diabète (Das *et al.*, 2018) ; (ii) en tant que guide de facteur de transcription notamment de SNAIL dans le cancer gastrique (Wang *et al.*, 2019) et (iii) en tant qu'éponge de miARN, notamment dans le rétinoblastome (Wang and Ji, 2020) et l'ostéoarthrite (Ai and Yu, 2019) (**Figure 59**). DNM3OS pourrait ainsi également participer au processus fibrotique par un mécanisme indépendant des miARN miR-199a-5p, miR-199a-3p et miR-214-3p.

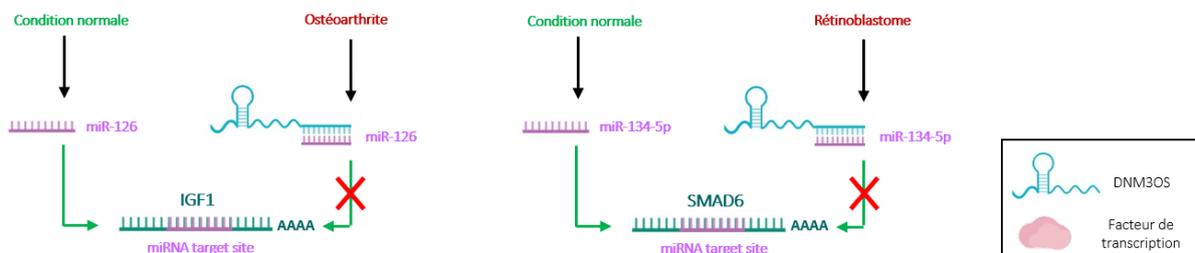
(i) Acétylation des histones dans le diabète



(ii) Guide de facteur de transcription



(iii) Eponge de miARN dans l'ostéoartrite et le rétinoblastome



**Figure 60 : Mécanismes d'action de DNMT3OS indépendant des miARN du cluster.** DNMT3OS régule l'expression des gènes (i) en modulant la méthylation de la chromatine par des mécanismes épigénétiques ; (ii) en guidant les facteurs de transcription ; (ii) en agissant en tant qu'éponge de miARN. D'après Fella et al., 2022.

Par ailleurs, une part importante des HCC se développe sur un terrain fibrotique (Baglieri, Brenner and Kisseleva, 2019). De plus, bien que peu nombreuses, certaines études sont en faveur de l'implication de DNMT3OS dans le cancer (Fella et al., 2022). En particulier, Wang et al. (2021) ont montré que le traitement de cellules d'hépatocarcinome par du milieu conditionné (provenant de cellules souches mésenchymateuses) induit la sur-expression de DNMT3OS. De plus, des niveaux élevés de DNMT3OS dans des échantillons provenant de patients atteints d'HCC sont associés à la progression tumorale et à une plus faible survie des patients (Wang et al., 2021). Dans ce contexte, DNMT3OS interagirait avec KDM6B (codant pour une histone déméthylase) induisant une déméthylation de l'ADN et la transcription du gène TIAM1 (TIAM rac1 associated GEF 1) impliqué dans la tumorigenèse (Huang et al., 2013; Wang et al., 2021). Il serait donc intéressant d'étudier les effets de l'inhibition de DNMT3OS dans le développement d'un hépatocarcinome à l'aide d'un modèle murin d'HCC induit par

l'administration chronique de CCl<sub>4</sub>. Cependant, dans ce modèle, le développement des tumeurs hépatiques est long (une centaine de semaines) (Heindryckx, Colle and Van Vlierberghe, 2009) et nécessite d'associer d'autres composés chimiques, tels que le Di-Ethyl Nitrosamine (DEN), pour accélérer le développement de l'HCC (Uehara, Pogribny and Rusyn, 2014).

Enfin, les mécanismes moléculaires étudiés dans cette étude, en particulier l'implication du TFG- $\beta$ , concernent également d'autres maladies fibrotiques (Weiskirchen, Weiskirchen and Tacke, 2019), il est donc raisonnable de penser que la stratégie d'inhibition de DNM3OS proposée pourrait aussi s'appliquer à d'autres types de fibrose d'organes. En particulier, le syndrome d'Alport, est une maladie héréditaire qui résulte d'un défaut de synthèse de collagène de type IV (COL4A3, COL4A4 et COL4A5) (Abrahamson *et al.*, 2009). Ce syndrome se traduit par une protéinurie, une fibrose interstitielle et une insuffisance rénale (Hudson *et al.*, 2003; Torra and Furlano, 2019). Etant donné le peu d'options thérapeutiques disponibles (Savige *et al.*, 2013), l'évaluation du bénéfice du ciblage de DNM3OS dans le syndrome d'Alport a été initiée dans l'équipe en utilisant des souris déficientes pour le gène *Col4a3* (Nozu *et al.*, 2019). Ainsi, le développement de molécules dirigées contre DNM3OS (ou un miARN du cluster) pourrait permettre à terme de limiter la progression de la fibrose, quel que soit l'organe touché et indépendamment de la cause.

Au total, mes travaux concernant le rôle et le potentiel thérapeutique de DNM3OS, offrent des perspectives intéressantes à la fois dans la fibrose hépatique mais également dans d'autres maladies fibro-prolifératives. De plus au niveau hépatique, l'inhibition de DNM3OS par un ASO pourrait être une stratégie de choix dans le traitement de l'HCC.

## II. Evaluation des effets néphro-protecteurs induits par l'inhibition du récepteur à l'adénosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R)

Le cisplatine est un agent anti-néoplasique très largement utilisé pour traiter les cancers solides dont les cancers du poumon, des testicules, des ovaires, ou encore dans des cancers gastriques (Ghosh, 2019a). Cependant, son utilisation est associée à l'apparition d'effets indésirables sévères nécessitant de diminuer les doses administrées voire d'arrêter le traitement (Pabla and Dong, 2008). En particulier, la néphrotoxicité est un effet indésirable majeur, qui touche plus d'un tiers des patients malgré la mise en place de moyens de prévention basés sur l'hydratation (Hayati *et al.*, 2015; Hamroun *et al.*, 2019). L'utilisation de modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* a permis d'améliorer la compréhension des mécanismes à l'origine des effets néphrotoxiques du Cisplatine. En effet, la forte réactivité du Cisplatine pour les constituants nucléophiles cellulaires induit une synthèse accrue d'espèces réactives de l'oxygène conduisant, principalement dans les cellules tubulaires proximales riches en mitochondries, à une cytotoxicité importante (Crona *et al.*, 2017). De nombreuses approches thérapeutiques cherchant à limiter la toxicité rénale du cisplatine ont été proposées ces dernières années (Humanes *et al.*, 2012; Galgamuwa *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). A titre d'exemples, ces approches visent à réduire l'absorption rénale (Ciarimboli *et al.*, 2005), limiter l'apoptose (Jiang *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007), administrer des anti-oxydants (Zunino *et al.*, 1989) ou encore limiter le processus inflammatoire (Ramesh and Reeves, 2004). Cependant, ce type d'approche ne se focalise généralement que sur un effet cellulaire du Cisplatine et ne permet pas d'atteindre une néphro-protection complète (Pabla and Dong, 2008). De plus, peu de molécules proposées ont fait l'objet d'études portant sur le retentissement de ces approches sur les propriétés anti-tumorales du cisplatine (Fang *et al.*, 2021).

L'implication de l'adénosine et de ses récepteurs dans de nombreux processus physiopathologiques a conduit au développement d'un nombre important de molécules permettant leur modulation pharmacologique (Saini *et al.*, 2022). Le récepteur A<sub>2A</sub>R est, en particulier, considéré comme une cible thérapeutique pertinente dans de nombreuses pathologies, en particulier la maladie de Parkinson, les désordres métaboliques, la fibrose cutanée, le cancer, les maladies cardio-vasculaires et rénales (Saini *et al.*, 2022).

Deux types d'antagonistes sont disponibles. D'une part, les antagonistes non-sélectifs de  $A_{2A}R$ , parmi lesquels la caféine est le chef de file (Saini *et al.*, 2022). La caféine est un anti-oxydant (Devasagayam *et al.*, 1996) qui présente des effets protecteurs dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Kolahdouzan and Hamadeh, 2017). En revanche, son effet bénéfique dans les maladies rénales est plus controversé (Curhan *et al.*, 1996). Les antagonistes sélectifs de  $A_{2A}R$ , quant à eux, suscitent un intérêt croissant (Saini *et al.*, 2022). Ainsi, depuis le début des années 2000, près de 30 essais cliniques évaluant des antagonistes sélectifs de  $A_{2A}R$  dans la maladie de Parkinson ont été mis en place (Chen and Cunha, 2020). Parmi les différents antagonistes du récepteur  $A_{2A}$ , nos travaux se sont focalisés sur l'istradefylline (KW6002). En effet, ce composé dispose d'ores et déjà d'une autorisation de mise sur le marché au Japon et aux Etats – Unis comme traitement d'appoint de la maladie de Parkinson (Chen and Cunha, 2020). De plus, l'administration régulière de cette molécule ne semble pas entraîner des effets indésirables majeurs, comme ont pu le montrer les essais cliniques de phase IIb et III réalisés sur plus de 4000 patients atteints de la maladie de Parkinson (Takahashi *et al.*, 2018; Chen and Cunha, 2020). Nos travaux ont ainsi permis de montrer que le KW2002 permet de limiter deux effets indésirables fréquents du cisplatine. En effet, l'administration de cette molécule en combinaison du cisplatine réduit à la fois la toxicité rénale et la neuropathie périphérique engendrées par cet anti-cancéreux. De manière intéressante, une étude récente a permis de confirmer l'intérêt de moduler pharmacologiquement le récepteur  $A_{2A}R$  grâce à l'istradefylline pour limiter la neurotoxicité induite par le CisPt (Oliveros *et al.*, 2022). Nous pourrions ainsi envisager par la suite d'évaluer les effets de ce blocage sur d'autres effets indésirables du CisPt, notamment l'ototoxicité et l'hépatotoxicité (Ghosh, 2019).

Par ailleurs, le KW6002 n'altère pas l'activité anti-tumorale du cisplatine, et semble même, sur certains paramètres, potentialiser son action sur les cellules tumorales. Cette propriété anti-tumorale potentielle du KW6002 peut être mise en relation avec le rôle désormais établi de l'adénosine dans le développement tumoral (Boison and Yegutkin, 2019). Ainsi, de nombreux essais cliniques sont en cours afin d'évaluer des stratégies d'inhibition de l'ectonucléotidase CD73, afin d'inhiber la production d'adénosine et par conséquent d'empêcher son interaction avec  $A_{2A}R$ , dans le traitement des tumeurs solides (Churov and Zhulai, 2021). De plus, le bénéfice de l'utilisation d'antagonistes du récepteur  $A_{2A}$  est actuellement testé dans des essais cliniques en tant que coadjuvants dans le traitement (NCT05024097) (Seitz *et al.*, 2019).

Au total, ces résultats nous permettent dès lors d'envisager la mise en place d'un essai clinique chez des patients atteints d'un cancer du poumon et traités par du cisplatine afin d'évaluer chez l'homme la pertinence de l'utilisation de l'istradefylline dans le cadre d'un repositionnement de molécule. Les études de sécurité et de tolérabilité ayant déjà été réalisées est un élément majeur qui pourrait permettre de réduire considérablement le temps et les coûts nécessaires au développement d'un médicament (Pushpakom *et al.*, 2019). Enfin, si ces données obtenues sont confortées, nous pourrions étendre notre étude à d'autres agents anti-néoplasiques présentant les mêmes modes d'action, en particulier les autres sels de platine (carboplatine et oxaliplatine), voire transférer cette approche à d'autres types de cancers traités par le cisplatine, tels que le cancer de l'ovaire (Alberts *et al.*, 1996), du testicule (Chaudhary and Haldas, 2003) ou de l'œsophage (Ilson, 2008).

De cette manière, nous pouvons envisager d'évaluer les effets de l'istradefylline sur la néphrotoxicité induite par le CisPt au cours d'un essai clinique, dans le cadre d'un repositionnement de molécule.

## Bibliographie

Aalbers, C.J., Tak, P.P. and Vervoordeldonk, M.J. (2011) 'Advancements in adeno-associated viral gene therapy approaches: exploring a new horizon', *F1000 Medicine Reports*, 3, p. 17. Available at: <https://doi.org/10.3410/M3-17>.

Abd Rashid, N. *et al.* (2021) 'The role of natural antioxidants in cisplatin-induced hepatotoxicity', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 144, p. 112328. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112328>.

Abebe, W. and Mustafa, S.J. (2002) 'Effects of adenosine analogs on inositol 1,4,5-trisphosphate production in porcine coronary artery', *Vascular Pharmacology*, 39(1–2), pp. 89–95. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1537-1891\(02\)00277-x](https://doi.org/10.1016/s1537-1891(02)00277-x).

Aberle, H. *et al.* (1997) 'beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway', *The EMBO journal*, 16(13), pp. 3797–3804. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797>.

Abplanalp, W.T. *et al.* (2020) 'Efficiency and Target Derepression of Anti-miR-92a: Results of a First in Human Study', *Nucleic Acid Therapeutics*, 30(6), pp. 335–345. Available at: <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0871>.

Abraham, J., Salama, N.N. and Azab, A.K. (2015) 'The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma', *Leukemia & Lymphoma*, 56(1), pp. 26–33. Available at: <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.907890>.

Abrahamson, D.R. *et al.* (2009) 'Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(7), pp. 1471–1479. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2008101086>.

Achour, B., Barber, J. and Rostami-Hodjegan, A. (2014) 'Expression of Hepatic Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes and Their Intercorrelations: A Meta-Analysis', *Drug Metabolism and Disposition*, 42(8), pp. 1349–1356. Available at: <https://doi.org/10.1124/dmd.114.058834>.

Adams, L.A. *et al.* (2005) 'Hepascore: An Accurate Validated Predictor of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Infection', *Clinical Chemistry*, 51(10), pp. 1867–1873. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.048389>.

Adebisi, M.G. *et al.* (2019) 'Differential role of adenosine signaling cascade in acute and chronic pain', *Neuroscience Letters*, 712, p. 134483. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134483>.

Adriaansen, J., Vervoordeldonk, M.J.B.M. and Tak, P.P. (2006) 'Gene therapy as a therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis: innovative vectors and therapeutic genes', *Rheumatology (Oxford, England)*, 45(6), pp. 656–668. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ke047>.

Agarwal *et al.* (2015) 'Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs', *eLife*, 4. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>.

- Ai, D. and Yu, F. (2019) 'LncRNA DNMT3OS promotes proliferation and inhibits apoptosis through modulating IGF1 expression by sponging MiR-126 in CHON-001 cells', *Diagnostic Pathology*, 14(1), p. 106. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0877-2>.
- Aires, I.D. *et al.* (2019) 'Blockade of microglial adenosine A2A receptor suppresses elevated pressure-induced inflammation, oxidative stress, and cell death in retinal cells', *Glia*, 67(5), pp. 896–914. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.23579>.
- Aithal, G. *et al.* (2011) 'Case Definition and Phenotype Standardization in Drug-Induced Liver Injury', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(6), pp. 806–815. Available at: <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.58>.
- Akhurst, R.J. and Hata, A. (2012) 'Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease', *Nature reviews. Drug discovery*, 11(10), pp. 790–811. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd3810>.
- Almazroo, O.A., Miah, M.K. and Venkataramanan, R. (2017) 'Drug Metabolism in the Liver', *Clinics in Liver Disease*, 21(1), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>.
- Alm-Eldeen, A.A. *et al.* (2016) 'Protective Role of Commiphora molmol Extract against Liver and Kidney Toxicity Induced by Carbon Tetrachloride in Mice', *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(1), pp. 65–72. Available at: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i1.9>.
- Altamirano-Barrera, A., Barranco-Fragoso, B. and Méndez-Sánchez, N. (2017) 'Management Strategies for Liver Fibrosis', *Annals of Hepatology*, 16(1), pp. 48–56. Available at: <https://doi.org/10.5604/16652681.1226814>.
- Ameres, S.L. and Zamore, P.D. (2013) 'Diversifying microRNA sequence and function', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), pp. 475–488. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3611>.
- Amodio, N. *et al.* (2018) 'MALAT1: a druggable long non-coding RNA for targeted anti-cancer approaches', *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0606-4>.
- Andersen, J. *et al.* (1987) 'The isolation and characterization of RNA coded by the micF gene in Escherichia coli.', *Nucleic Acids Research*, 15(5), pp. 2089–2101.
- Angulo, P. *et al.* (2007) 'The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD', *Hepatology*, 45(4), pp. 846–854. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.21496>.
- Angulo, P. *et al.* (2013) 'Simple Noninvasive Systems Predict Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Gastroenterology*, 145(4), pp. 782–789.e4. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.057>.
- Bennet, F. *et al.* (2000) 'Antisense Oligonucleotide-based Therapeutics', *Gene Therapy*. CRC Press, pp. 365–392. Available at: <https://doi.org/10.1201/9781420002126-26>.
- Antonioli, L. *et al.* (2008) 'Regulation of enteric functions by adenosine: Pathophysiological and pharmacological implications', *Pharmacology & Therapeutics*, 120(3), pp. 233–253. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.08.010>.
- Antonioli, L. *et al.* (2019) 'Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much', *Immunology Letters*, 205, pp. 9–15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imllet.2018.04.006>.

- Arasi, F.P., Shahrestanaki, M.K. and Aghaei, M. (2019) 'A2a adenosine receptor agonist improves endoplasmic reticulum stress in MIN6 cell line through protein kinase A/ protein kinase B/ Cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein/ and Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible 34/ eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  pathways', *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), pp. 10500–10511. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.27719>.
- Argyriou, A.A. *et al.* (2012) 'Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): An update', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 82(1), pp. 51–77. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.04.012>.
- Arınc, E., Arslan, Ş. and Adalı, O. (2005) 'Differential effects of diabetes on CYP2E1 and CYP2B4 proteins and associated drug metabolizing enzyme activities in rabbit liver', *Archives of Toxicology*, 79(8), pp. 427–433. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0654-8>.
- Arrighi, N. *et al.* (2021) 'The FibromiR miR-214-3p Is Upregulated in Duchenne Muscular Dystrophy and Promotes Differentiation of Human Fibro-Adipogenic Muscle Progenitors', *Cells*, 10(7), p. 1832. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10071832>.
- Asami, Y. *et al.* (2021) 'Efficient Gene Suppression by DNA/DNA Double-Stranded Oligonucleotide In Vivo', *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 29(2), pp. 838–847. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.10.017>.
- Asrani, S.K. *et al.* (2019) 'Burden of liver diseases in the world', *Journal of Hepatology*, 70(1), pp. 151–171. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>.
- Awad, A.S. *et al.* (2006) 'Adenosine A2A receptor activation attenuates inflammation and injury in diabetic nephropathy', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(4), pp. F828–F837. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00310.2005>.
- Ayala, A., Muñoz, M.F. and Argüelles, S. (2014) 'Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, p. e360438. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- Baba, S. *et al.* (2004) 'Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse', *Journal of Hepatology*, 40(2), pp. 255–260. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.10.012>.
- Bafna, P. *et al.* (2021) 'Prevalence of liver fibrosis by Fibroscan in patients on long-term methotrexate therapy for rheumatoid arthritis', *Clinical Rheumatology*, 40(9), pp. 3605–3613. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10067-021-05678-8>.
- Baglieri, J., Brenner, D.A. and Kisseleva, T. (2019) 'The Role of Fibrosis and Liver-Associated Fibroblasts in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), p. 1723. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20071723>.
- Bansal, M.B. *et al.* (2005) 'Interleukin-6 protects hepatocytes from CCl<sub>4</sub>-mediated necrosis and apoptosis in mice by reducing MMP-2 expression', *Journal of hepatology*, 42(4), pp. 548–556. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.11.043>.
- Bao, Y. *et al.* (2021) 'Animal and Organoid Models of Liver Fibrosis', *Frontiers in Physiology*, 12, p. 666138. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.666138>.
- Bartel, D.P. (2004) 'MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function', *Cell*, 116(2), pp. 281–297. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).

- Bartel, D.P. (2009) 'MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions', *Cell*, 136(2), pp. 215–233. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
- Bartel, D.P. (2018) 'Metazoan MicroRNAs', *Cell*, 173(1), pp. 20–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>.
- Bataller, R. and Brenner, D.A. (2005) 'Liver fibrosis', *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), pp. 209–218. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI24282>.
- Bearcroft, C. *et al.* (1999) 'Cisplatin impairs fluid and electrolyte absorption in rat small intestine: a role for 5-hydroxytryptamine', *Gut*, 44(2). Available at: <https://doi.org/10.1136/gut.44.2.174>.
- Bedossa, P., Dargère, D. and Paradis, V. (2003) 'Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C', *Hepatology*, 38(6), pp. 1449–1457. Available at: <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.09022>.
- Behrens, J. *et al.* (1996) 'Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1', *Nature*, 382(6592). Available at: <https://doi.org/10.1038/382638a0>.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) 'Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing', *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), pp. 289–300. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.
- Bennett, C.F. *et al.* (2017) 'Pharmacology of Antisense Drugs', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57, pp. 81–105. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104846>.
- Bennett, C.F. (2019) 'Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age', *Annual Review of Medicine*, 70(1), pp. 307–321. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217-010829>.
- Bernardo, B.C. *et al.* (2012) 'Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43), pp. 17615–17620. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1206432109>.
- Bhaskaran, M. and Mohan, M. (2014) 'MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease', *Veterinary pathology*, 51(4), pp. 759–774. Available at: <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>.
- Bielefeld, K.A. *et al.* (2011) 'Fibronectin and  $\beta$ -Catenin Act in a Regulatory Loop in Dermal Fibroblasts to Modulate Cutaneous Healing', *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), pp. 27687–27697. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.261677>.
- Biscans, A. *et al.* (2019) 'The valency of fatty acid conjugates impacts siRNA pharmacokinetics, distribution, and efficacy in vivo', *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 302, pp. 116–125. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.028>.
- Björnsson, H. and Björnsson, E. (2022) 'Drug-induced liver injury: Pathogenesis, epidemiology, clinical features, and practical management', *European Journal of Internal Medicine*, 97, pp. 26–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2021.10.035>.
- Bleasby, K. *et al.* (2006) 'Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: A resource for investigations into drug disposition', *Xenobiotica*, 36(10–11), pp. 963–988. Available at: <https://doi.org/10.1080/00498250600861751>.

- Bock, K.W. (2019) 'Aryl hydrocarbon receptor (AHR): From selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions', *Biochemical Pharmacology*, 168, pp. 65–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.015>.
- Bohnert, T. *et al.* (2016) 'Evaluation of a New Molecular Entity as a Victim of Metabolic Drug-Drug Interactions-an Industry Perspective', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 44(8), pp. 1399–1423. Available at: <https://doi.org/10.1124/dmd.115.069096>.
- Boison, D. and Yegutkin, G.G. (2019) 'Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy', *Cancer Cell*, 36(6), pp. 582–596. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.10.007>.
- Boniakowski, A.E. *et al.* (2017) 'Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 199(1), pp. 17–24. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700223>.
- Bonnans, C., Chou, J. and Werb, Z. (2014) 'Remodelling the extracellular matrix in development and disease', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(12), pp. 786–801. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.
- Borea, P.A. *et al.* (2018) 'Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art', *Physiological Reviews*, 98(3), pp. 1591–1625. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>.
- Budu, A. *et al.* (2021) 'Renal fibrosis due to multiple cisplatin treatment is exacerbated by kinin B1 receptor antagonism', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 54(12), p. e11353. Available at: <https://doi.org/10.1590/1414-431X2021e11353>.
- Bülöw, R.D. and Boor, P. (2019) 'Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 67(9), pp. 643–661. Available at: <https://doi.org/10.1369/0022155419849388>.
- Burgy, O. and Königshoff, M. (2018) 'The WNT signaling pathways in wound healing and fibrosis', *Matrix Biology*, 68–69, pp. 67–80. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.017>.
- Burns, W.C., Kantharidis, P. and Thomas, M.C. (2007) 'The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease', *Cells, Tissues, Organs*, 185(1–3), pp. 222–231. Available at: <https://doi.org/10.1159/000101323>.
- Burnstock, G. (1978) 'A basis for distinguishing two types of purinergic receptor'.
- Byass, P. (2014) 'The global burden of liver disease: a challenge for methods and for public health', *BMC medicine*, 12, p. 159. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0159-5>.
- Cameron, G.R. and Karunaratne, W.A.E. (1936) 'Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration', *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 42(1), pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.1700420104>.
- Campana, L. and Iredale, J.P. (2017) 'Regression of Liver Fibrosis', *Seminars in Liver Disease*, 37(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597816>.
- Carozzi, V.A., Canta, A. and Chiorazzi, A. (2015) 'Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms?', *Neuroscience Letters*, 596, pp. 90–107. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.014>.

- Cascinu, S. *et al.* (2002) 'Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(16), pp. 3478–3483. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.07.061>.
- Cassiman, D. *et al.* (2002) 'Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers', *Journal of Hepatology*, 36(2), pp. 200–209. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00260-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00260-4).
- Chaikuad, A. and Bullock, A.N. (2016) 'Structural Basis of Intracellular TGF- $\beta$  Signaling: Receptors and Smads', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(11), p. a022111. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022111>.
- Chang, C.-P. *et al.* (2021) 'Emerging roles of dysregulated adenosine homeostasis in brain disorders with a specific focus on neurodegenerative diseases', *Journal of Biomedical Science*, 28(1), p. 70. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00766-y>.
- Chaudhuri, A.A. *et al.* (2011) 'MiR-125b potentiates macrophage activation', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(10), p. 5062. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102001>.
- Chavez, E. *et al.* (2022) 'Novel Therapies for Alport Syndrome', *Frontiers in Medicine*, 9, p. 848389. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.848389>.
- Chen, H., Wang, X. and Gou, S. (2019) 'A cisplatin-based platinum(IV) prodrug containing a glutathione s-transferase inhibitor to reverse cisplatin-resistance in non-small cell lung cancer', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 193, pp. 133–142. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.014>.
- Chen, J.-F. and Cunha, R.A. (2020) 'The belated US FDA approval of the adenosine A2A receptor antagonist istradefylline for treatment of Parkinson's disease', *Purinergic Signalling*, 16(2), pp. 167–174. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09694-2>.
- Chen, L. and DiPietro, L.A. (2017) 'Toll-Like Receptor Function in Acute Wounds', *Advances in Wound Care*, 6(10), pp. 344–355. Available at: <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0734>.
- Chen, P.Y. *et al.* (2008) 'Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity', *RNA*, 14(2), pp. 263–274. Available at: <https://doi.org/10.1261/rna.789808>.
- Chen, W.J., Chi, E.Y. and Smuckler, E.A. (1977) 'Carbon tetrachloride-induced changes in mixed function oxidases and microsomal cytochromes in the rat lung', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 36(4), pp. 388–394.
- Cheng, Y. *et al.* (2022) 'miR-214-3p Protects and Restores the Myocardial Tissue of Rat Myocardial Infarction Model by Targeting PTEN', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2022, p. 1175935. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/1175935>.
- Chhabra, R., Dubey, R. and Saini, N. (2010) 'Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 cluster and its implication in human diseases', *Molecular Cancer*, 9, p. 232. Available at: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-232>.
- Chi, S.W. *et al.* (2009) 'Ago HITS-CLIP decodes miRNA-mRNA interaction maps', *Nature*, 460(7254), pp. 479–486. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08170>.

- Chiang, H.R. *et al.* (2010) 'Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes', *Genes & Development*, 24(10), pp. 992–1009. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1884710>.
- Chioccioli, M. *et al.* (2022) 'A lung targeted miR-29 mimic as a therapy for pulmonary fibrosis', *EBioMedicine*, 85, p. 104304. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104304>.
- Chiu, Y.-L. and Rana, T.M. (2003) 'siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis', *RNA*, 9(9), pp. 1034–1048. Available at: <https://doi.org/10.1261/rna.5103703>.
- Choi, J.H. *et al.* (2002) 'Successful treatment of cisplatin overdose with plasma exchange', *Yonsei Medical Journal*, 43(1), pp. 128–132. Available at: <https://doi.org/10.3349/ymj.2002.43.1.128>.
- Churov, A. and Zhulai, G. (2021) 'Targeting adenosine and regulatory T cells in cancer immunotherapy', *Human Immunology*, 82(4), pp. 270–278. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.12.005>.
- Ciarimboli, G. *et al.* (2005) 'Cisplatin Nephrotoxicity Is Critically Mediated via the Human Organic Cation Transporter 2', *The American Journal of Pathology*, 167(6), pp. 1477–1484. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61234-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61234-5).
- Ciarimboli, G. (2012) 'Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Effects and Side Effects', *Scientifica*, 2012, pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.6064/2012/473829>.
- Clark, D.A. and Coker, R. (1998) 'Transforming growth factor-beta (TGF-beta)', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(3), pp. 293–298. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00128-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00128-3).
- Clevers, H. (2006) 'Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease', *Cell*, 127(3), pp. 469–480. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>.
- Cocetta, V., Ragazzi, E. and Montopoli, M. (2019) 'Mitochondrial Involvement in Cisplatin Resistance', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), p. 3384. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20143384>.
- Cohnheim, J. (1867) 'Ueber Entzündung und Eiterung', *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, 40(1), pp. 1–79. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02968135>.
- Constandinou, C., Henderson, N. and Iredale, J.P. (2005) 'Modeling liver fibrosis in rodents', *Methods in Molecular Medicine*, 117, pp. 237–250. Available at: <https://doi.org/10.1385/1-59259-940-0:237>.
- Cooper, D.Y., Schleyer, H. and Rosenthal, O. (1970) 'Some chemical properties of cytochrome P-450 and its carbon monoxide compound (P-450.CO)', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 174(1), pp. 205–217. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1970.tb49787.x>.
- Coppi, E. *et al.* (2022) 'Therapeutic Potential of Highly Selective A3 Adenosine Receptor Ligands in the Central and Peripheral Nervous System', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(6), p. 1890. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27061890>.

- Cordon-Cardo, C. *et al.* (1990) 'Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 38(9), pp. 1277–1287. Available at: <https://doi.org/10.1177/38.9.1974900>.
- Cornelison, T.L. and Reed, E. (1993) 'Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin', *Gynecologic Oncology*, 50(2), pp. 147–158. Available at: <https://doi.org/10.1006/gyno.1993.1184>.
- Costanza, B. *et al.* (2017) 'Stromal Modulators of TGF- $\beta$  in Cancer', *Journal of Clinical Medicine*, 6(1), p. 7. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm6010007>.
- Crona, D.J. *et al.* (2017) 'A Systematic Review of Strategies to Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity', *The Oncologist*, 22(5), pp. 609–619. Available at: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0319>.
- Curhan, G.C. *et al.* (1996) 'Prospective study of beverage use and the risk of kidney stones', *American Journal of Epidemiology*, 143(3), pp. 240–247. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a008734>.
- Dai, L. *et al.* (2019) 'miR-21 regulates growth and EMT in lung cancer cells via PTEN/Akt/GSK3 $\beta$  signaling', *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 24(8), pp. 1426–1439. Available at: <https://doi.org/10.2741/4788>.
- Dakhlallah, D. *et al.* (2013) 'Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(4), pp. 397–405. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201205-0888OC>.
- D'Ambrosio, R. *et al.* (2012) 'A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(2), pp. 532–543. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.25606>.
- Darby, I.A. *et al.* (2014) 'Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing', *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, pp. 301–311. Available at: <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>.
- Das, S. *et al.* (2018) 'Diabetes Mellitus-Induced Long Noncoding RNA Dnm3os Regulates Macrophage Functions and Inflammation via Nuclear Mechanisms', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(8), pp. 1806–1820. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310663>.
- Dasari, S. and Tchounwou, P.B. (2014) 'Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action', *European journal of pharmacology*, 740, pp. 364–378. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- Davidson, L.A., Keller, R. and DeSimone, D.W. (2004) 'Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*', *Developmental Dynamics*, 231(4), pp. 888–895. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvdy.20217>.
- Deeley, R.G. and Cole, S.P.C. (2006) 'Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1)', *FEBS Letters*, 580(4), pp. 1103–1111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.036>.

- de Groot, H. and Noll, T. (1986) 'The crucial role of low steady state oxygen partial pressures in haloalkane free-radical-mediated lipid peroxidation. Possible implications in haloalkane liver injury', *Biochemical Pharmacology*, 35(1), pp. 15–19. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90546-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90546-0).
- Derynck, R. and Budi, E.H. (2019) 'Specificity, versatility and control of TGF- $\beta$  family signaling', *Science signaling*, 12(570), p. eaav5183. Available at: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav5183>.
- Desvignes, T., Contreras, A. and Postlethwait, J.H. (2014) 'Evolution of the miR199-214 cluster and vertebrate skeletal development', *RNA biology*, 11(4), pp. 281–294. Available at: <https://doi.org/10.4161/rna.28141>.
- Devasagayam, T.P. *et al.* (1996) 'Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1282(1), pp. 63–70. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(96\)00040-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(96)00040-5).
- Dewaeles, E. *et al.* (2022) 'Istradefylline protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin antitumor effects', *The Journal of Clinical Investigation*, 132(22), p. e152924. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI152924>.
- Diegelmann, R.F. and Evans, M.C. (2004) 'Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing', *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 9, pp. 283–289. Available at: <https://doi.org/10.2741/1184>.
- Ding, D. *et al.* (2018) 'LncRNA H19/miR-29b-3p/PGRN Axis Promoted Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer Cells by Acting on Wnt Signaling', *Molecules and Cells*, 41(5), pp. 423–435. Available at: <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2258>.
- Ding, R. *et al.* (2021) 'DZNep, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, suppresses hepatic fibrosis through regulating miR-199a-5p/SOCS7 pathway', *PeerJ*, 9, p. e11374. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.11374>.
- Ding, X. and Kaminsky, L.S. (2003) 'Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, pp. 149–173. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140251>.
- DiNicolantonio, J.J. and Barroso-Aranda, J. (2020) 'Harnessing adenosine A2A receptors as a strategy for suppressing the lung inflammation and thrombotic complications of COVID-19: Potential of pentoxifylline and dipyridamole', *Medical Hypotheses*, 143, p. 110051. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110051>.
- DiPietro, L.A. (2016) 'Angiogenesis and wound repair: when enough is enough', *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5), pp. 979–984. Available at: <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R>.
- Dixon, A.K. *et al.* (1996) 'Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat', *British Journal of Pharmacology*, 118(6), pp. 1461–1468. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15561.x>.
- Dong, S. *et al.* (2016) 'Mechanisms of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis', *The Journal of Toxicological Sciences*, 41(4), pp. 561–572. Available at: <https://doi.org/10.2131/jts.41.561>.

Döring, B. and Petzinger, E. (2014) 'Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism', *Drug Metabolism Reviews*, 46(3), pp. 261–282. Available at: <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.882353>.

Dou, L. *et al.* (2018) 'Extracellular ATP signaling and clinical relevance', *Clinical Immunology*, 188, pp. 67–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.12.006>.

Duspara, K. *et al.* (2021) 'Targeting the Wnt Signaling Pathway in Liver Fibrosis for Drug Options: An Update', *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 9(6), pp. 960–971. Available at: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00065>.

Ebisawa, T. *et al.* (2001) 'Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(16), pp. 12477–12480. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C100008200>.

Eckstein, F. (2000) 'Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them?', *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 10(2), pp. 117–121. Available at: <https://doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.117>.

Edwards, I.R. and Aronson, J.K. (2000) 'Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management', *The Lancet*, 356(9237), pp. 1255–1259. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02799-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02799-9).

el Azzouzi, H. *et al.* (2013) 'The Hypoxia-Inducible MicroRNA Cluster miR-199a~214 Targets Myocardial PPAR $\delta$  and Impairs Mitochondrial Fatty Acid Oxidation', *Cell Metabolism*, 18(3), pp. 341–354. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.009>.

Eljack, N.D. *et al.* (2014) 'Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin', *Metallomics*, 6(11), pp. 2126–2133. Available at: <https://doi.org/10.1039/c4mt00238e>.

Ellis, E.L. and Mann, D.A. (2012) 'Clinical evidence for the regression of liver fibrosis', *Journal of Hepatology*, 56(5), pp. 1171–1180. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.09.024>.

El-Serag, H.B. (2011) 'Hepatocellular carcinoma', *The New England Journal of Medicine*, 365(12), pp. 1118–1127. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001683>.

Esteller, M. (2011) 'Non-coding RNAs in human disease', *Nature Reviews Genetics*, 12(12), pp. 861–874. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3074>.

Fallowfield, J.A. and Iredale, J.P. (2004) 'Targeted treatments for cirrhosis', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 8(5), pp. 423–435. Available at: <https://doi.org/10.1517/14728222.8.5.423>.

Fang, C. *et al.* (2021) 'Natural products: potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity', *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(12), pp. 1951–1969. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00620-9>.

Fang, Y. *et al.* (2020) 'The ageing kidney: Molecular mechanisms and clinical implications', *Ageing research reviews*, 63, p. 101151. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101151>.

Faulds, D., Chrisp, P. and Buckley, M.M.-T. (1991) 'Adenosine', *Drugs*, 41(4), pp. 596–624. Available at: <https://doi.org/10.2165/00003495-199141040-00007>.

- Felli, X. *et al.* (2018) 'MicroRNA-34a-5p inhibits liver fibrosis by regulating TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway in hepatic stellate cells', *Cell Biology International*, 42(10), pp. 1370–1376. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbin.11022>.
- Fellah, S. *et al.* (2022) 'Pervasive role of the long noncoding RNA DNMT3OS in development and diseases', *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, p. e1736. Available at: <https://doi.org/10.1002/wrna.1736>.
- Ferre, S. *et al.* (1991) 'Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), pp. 7238–7241. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7238>.
- Fidler, A.L. *et al.* (2018) 'The triple helix of collagens – an ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution', *Journal of Cell Science*, 131(7), p. jcs203950. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.203950>.
- Finkel, R.S. *et al.* (2017) 'Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy', *The New England Journal of Medicine*, 377(18), pp. 1723–1732. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>.
- Flockhart, D. *et al.* (2021) 'The Flockhart Cytochrome P450 Drug-Drug Interaction Table'.
- Frantz, C., Stewart, K.M. and Weaver, V.M. (2010) 'The extracellular matrix at a glance', *Journal of Cell Science*, 123(24), pp. 4195–4200. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
- Fraquelli, M. *et al.* (2007) 'Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease', *Gut*, 56(7), pp. 968–973. Available at: <https://doi.org/10.1136/gut.2006.111302>.
- Fredholm, B.B. *et al.* (2001) 'International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors', *Pharmacological Reviews*, 53(4), pp. 527–552.
- Fredholm, B.B. *et al.* (2011) 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update', *Pharmacological Reviews*, 63(1), pp. 1–34. Available at: <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>.
- Frezza, E.E. *et al.* (1994) 'CCL4-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in rats: relationship to plasma zinc, copper and estradiol levels', *Hepato-Gastroenterology*, 41(4), pp. 367–369.
- Friedman, S.L. (2008) 'Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis', *Gastroenterology*, 134(6), pp. 1655–1669. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>.
- Friedman, S.L. (2010) 'Evolving challenges in hepatic fibrosis', *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 7(8), pp. 425–436. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.97>.
- Fuertes, M.A. *et al.* (2002) 'Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs', *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 2(4), pp. 539–551.
- Fulda, S., Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2010) 'Targeting mitochondria for cancer therapy', *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(6), pp. 447–464. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd3137>.

Fuxe, K. *et al.* (2003) 'Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: Relevance for striatal function and Parkinson's disease', *Neurology*, 61(11 suppl 6), pp. S19–S23. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000095206.44418.5C>.

Gabbiani, G., Ryan, G.B. and Majne, G. (1971) 'Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction', *Experientia*, 27(5), pp. 549–550. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02147594>.

Galgamuwa, R. *et al.* (2016) 'Dichloroacetate Prevents Cisplatin-Induced Nephrotoxicity without Compromising Cisplatin Anticancer Properties', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 27(11), pp. 3331–3344. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2015070827>.

Gallant-Behm, C.L. *et al.* (2019) 'A MicroRNA-29 Mimic (Replarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin', *Journal of Investigative Dermatology*, 139(5), pp. 1073–1081. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.007>.

Garcia, G.E. *et al.* (2011) 'Adenosine A(2A) receptor activation prevents progressive kidney fibrosis in a model of immune-associated chronic inflammation', *Kidney International*, 80(4), pp. 378–388. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.2011.101>.

GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2017) 'Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *Lancet (London, England)*, 390(10100), pp. 1211–1259. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2).

Geary, R.S. *et al.* (2015) 'Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, pp. 46–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.008>.

George, E.L. *et al.* (1993) 'Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin', *Development (Cambridge, England)*, 119(4), pp. 1079–1091. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.119.4.1079>.

Gerloff, T. (2004) 'Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(1), pp. 69–77. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0813-5>.

Ghallab, A. and Hengstler, J. (2018) 'Liver Regeneration and New Technical Possibilities by Two-photon Based Intravital Imaging', *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*, 1(1), pp. 4–15. Available at: <https://doi.org/10.21608/svu.2018.17918>.

Ghanbarian, H., Yildiz, M.T. and Tutar, Y. (2022) 'MicroRNA Targeting', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2257, pp. 105–130. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_6).

Ghosh, S. (2019) 'Cisplatin: The first metal based anticancer drug', *Bioorganic Chemistry*, 88, p. 102925. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>.

Ghura, H. *et al.* (2021) 'Inhibition of fibronectin accumulation suppresses tumor growth', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 23(9), pp. 837–850. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.06.012>.

Gill, A. *et al.* (2009) 'Protective effect of tonapofylline (BG9928), an adenosine A1 receptor antagonist, against cisplatin-induced acute kidney injury in rats', *American Journal of Nephrology*, 30(6), pp. 521–526. Available at: <https://doi.org/10.1159/000248762>.

Gillette, J.R., Mitchell, J.R. and Brodie, B.B. (1974) 'Biochemical Mechanisms of Drug Toxicity', *Annual Review of Pharmacology*, 14(1), pp. 271–288. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.14.040174.001415>.

Golebiewska, E.M. and Poole, A.W. (2015) 'Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond', *Blood Reviews*, 29(3), pp. 153–162. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>.

Gomez, I.G. *et al.* (2015) 'Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways', *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), pp. 141–156. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI75852>.

Grinnell, F., Billingham, R.E. and Burgess, L. (1981) 'Distribution of fibronectin during wound healing in vivo', *The Journal of Investigative Dermatology*, 76(3), pp. 181–189. Available at: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12525694>.

Guengerich, F. (2015) 'Human cytochrome P450 enzymes', 4, pp. 523–785.

Guengerich, F.P. (2001) *Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity*, ACS Publications. American Chemical Society. Available at: <https://doi.org/10.1021/tx0002583>.

Gui, L. *et al.* (2006) 'Identification of the Heparin-binding Determinants within Fibronectin Repeat III1', *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), pp. 34816–34825. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M608611200>.

Gupta, A. *et al.* (2021) 'Nucleic acid delivery for therapeutic applications', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 178, p. 113834. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113834>.

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

Hakkola, J. *et al.* (2020) 'Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update', *Archives of Toxicology*, 94(11), pp. 3671–3722. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02936-7>.

Halfter, W. *et al.* (2015) 'New concepts in basement membrane biology', *The FEBS Journal*, 282(23), pp. 4466–4479. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.13495>.

Hamburg-Shields, E. *et al.* (2015) 'Sustained  $\beta$ -catenin activity in dermal fibroblasts promotes fibrosis by up-regulating expression of extracellular matrix protein-coding genes', *The Journal of Pathology*, 235(5), pp. 686–697. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.4481>.

Hamroun, A. *et al.* (2019) 'Prevention of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Drugs*, 79(14), pp. 1567–1582. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01182-1>.

Han, S.W. and Roman, J. (2006) 'Fibronectin induces cell proliferation and inhibits apoptosis in human bronchial epithelial cells: pro-oncogenic effects mediated by PI3-kinase and NF-kappa B', *Oncogene*, 25(31), pp. 4341–4349. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209460>.

- Hanigan, M.H. and Devarajan, P. (2003) 'Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms', *Cancer Therapy*, 1, pp. 47–61.
- Hashimoto, N. *et al.* (2010) 'Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 43(2), pp. 161–172. Available at: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0031OC>.
- Hassan, S.M.A. *et al.* (2022) 'Alleviation of cisplatin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by L-carnitine', *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25(7), pp. 897–903. Available at: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.65427.14395>.
- Haverkamp, R.G. *et al.* (2022) 'Collagen dehydration', *International Journal of Biological Macromolecules*, 216, pp. 140–147. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.180>.
- Hayati, F. *et al.* (2015) 'Prevention of cisplatin nephrotoxicity', *Journal of nephro pharmacology*, 5(1). Available at: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/28197500/> (Accessed: 2 January 2023).
- Headrick, J.P. *et al.* (2013) 'Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions', *Pharmacology & Therapeutics*, 140(1), pp. 92–111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.002>.
- Heindryckx, F., Colle, I. and Van Vlierberghe, H. (2009) 'Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research', *International Journal of Experimental Pathology*, 90(4), pp. 367–386. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00656.x>.
- Heino, J. (2007) 'The collagen family members as cell adhesion proteins', *BioEssays*, 29(10), pp. 1001–1010. Available at: <https://doi.org/10.1002/bies.20636>.
- Hellerbrand, C. *et al.* (1999) 'The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo', *Journal of Hepatology*, 30(1), pp. 77–87. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(99\)80010-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(99)80010-5).
- Henderson, N.C. *et al.* (2013) 'Targeting of  $\alpha$ v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs', *Nature Medicine*, 19(12), pp. 1617–1624. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3282>.
- Hernandez-Gea, V. and Friedman, S.L. (2011) 'Pathogenesis of liver fibrosis', *Annual Review of Pathology*, 6, pp. 425–456. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130246>.
- Heslop, J.A. *et al.* (2017) 'Mechanistic evaluation of primary human hepatocyte culture using global proteomic analysis reveals a selective dedifferentiation profile', *Archives of Toxicology*, 91(1), pp. 439–452. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1694-y>.
- van den Heuvel, S.A.S. *et al.* (2017) 'Intravenous Lidocaine: Old-School Drug, New Purpose—Reduction of Intractable Pain in Patients with Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy', *Pain Research & Management*, 2017, p. 8053474. Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/8053474>.
- Higashi, T., Friedman, S.L. and Hoshida, Y. (2017) 'Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis', *Advanced drug delivery reviews*, 121, pp. 27–42. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>.

- Higgins, S.P. *et al.* (2018) 'TGF- $\beta$ 1/p53 signaling in renal fibrogenesis', *Cellular Signalling*, 43, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.11.005>.
- Higuchi, K. and Yanagawa, T. (2019) 'Evaluating dose of cisplatin responsible for causing nephrotoxicity', *PLoS One*, 14(4), p. e0215757. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215757>.
- Hines, R.N. and McCarver, D.G. (2002) 'The Ontogeny of Human Drug-Metabolizing Enzymes: Phase I Oxidative Enzymes', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(2), pp. 355–360. Available at: <https://doi.org/10.1124/jpet.300.2.355>.
- Hinz, B. *et al.* (2001) 'Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation', *The American Journal of Pathology*, 159(3), pp. 1009–1020. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61776-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61776-2).
- Hinz, B. *et al.* (2007) 'The myofibroblast: one function, multiple origins', *The American Journal of Pathology*, 170(6), pp. 1807–1816. Available at: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070112>.
- Hinz, B., McCulloch, C.A. and Coelho, N.M. (2019) 'Mechanical regulation of myofibroblast phenoconversion and collagen contraction', *Experimental Cell Research*, 379(1), pp. 119–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.03.027>.
- Holditch, S.J. *et al.* (2019) 'Recent Advances in Models, Mechanisms, Biomarkers, and Interventions in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), p. 3011. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20123011>.
- Hollenbach, M. (2017) 'The Role of Glyoxalase-I (Glo-I), Advanced Glycation Endproducts (AGEs), and Their Receptor (RAGE) in Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma (HCC)', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), p. 2466. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18112466>.
- Holmes, V.F. (1990) 'Rifampin-induced methadone withdrawal in AIDS', *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 10(6), pp. 443–444.
- Holtzman, J.L. (1982) 'Minireview: role of reactive oxygen and metabolite binding in drug toxicity', *Life Sciences*, 30(1), pp. 1–9. Available at: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(82\)90629-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90629-4).
- Hong, D.S. *et al.* (2020) 'Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours', *British Journal of Cancer*, 122(11), pp. 1630–1637. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0802-1>.
- Honnegowda, T.M. *et al.* (2015) 'Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing', *Plast Aesthet Res*, 2, pp. 239–42. Available at: <https://doi.org/10.4103/2347-9264.165438>.
- Hoy, H., Lynch, T. and Beck, M. (2019) 'Surgical Treatment of Lung Cancer', *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 31(3), pp. 303–313. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2019.05.002>.
- Hrubisko, M., McGown, A.T. and Fox, B.W. (1993) 'The role of metallothionein, glutathione, glutathione S-transferases and DNA repair in resistance to platinum drugs in a series of L1210 cell lines made resistant to anticancer platinum agents', *Biochemical Pharmacology*, 45(1), pp. 253–256. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90399-h](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90399-h).

- Hu, L.-Y. *et al.* (2019) 'Prevention and Treatment for Chemotherapy-Induced Peripheral [SEP]Neuropathy: Therapies Based on CIPN Mechanisms', *Current Neuropharmacology*, 17(2), pp. 184–196. Available at: <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170915143217>.
- Hu, N. *et al.* (2014) 'Increased levels of fatty acids contributed to induction of hepatic CYP3A4 activity induced by diabetes - in vitro evidence from HepG2 cell and Fa2N-4 cell lines', *Journal of Pharmacological Sciences*, 124(4), pp. 433–444. Available at: <https://doi.org/10.1254/jphs.13212fp>.
- Huang, C.-H. *et al.* (2019) 'Amiodarone and risk of liver cirrhosis: a nationwide, population-based study', *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 15, pp. 103–112. Available at: <https://doi.org/10.2147/TCRM.S174868>.
- Huang, J. *et al.* (2013) 'Tiam1 is associated with hepatocellular carcinoma metastasis', *International Journal of Cancer*, 132(1), pp. 90–100. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.27627>.
- Hudson, B.G. *et al.* (2003) 'Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen', *The New England Journal of Medicine*, 348(25), pp. 2543–2556. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra022296>.
- Humanes, B. *et al.* (2012) 'Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats', *Kidney International*, 82(6), pp. 652–663. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.2012.199>.
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011) 'Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay', *Nature Reviews. Genetics*, 12(2), pp. 99–110. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg2936>.
- Hynes, R.O. (1986) 'Fibronectins', *Scientific American*, 254(6), pp. 42–51. Available at: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0686-42>.
- Hynes, R.O. (1992) 'Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion', *Cell*, 69(1), pp. 11–25. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90115-S](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90115-S).
- Hynes, R.O. (2009) 'The extracellular matrix: not just pretty fibrils', *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), pp. 1216–1219. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1176009>.
- Hynes, R.O. and Naba, A. (2012) 'Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), p. a004903. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>.
- Idle, J.R. and Gonzalez, F.J. (2007) 'Metabolomics', *Cell Metabolism*, 6(5), pp. 348–351. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.005>.
- Ikeda, S. *et al.* (2007) 'Altered microRNA expression in human heart disease', *Physiological Genomics*, 31(3), pp. 367–373. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00144.2007>.
- Ingelman-Sundberg, M. (2004) 'Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(1), pp. 89–104. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0819-z>.
- Ingelman-Sundberg, M. *et al.* (2007) 'Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects', *Pharmacology & Therapeutics*, 116(3), pp. 496–526. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>.

Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. and McLellan, R.A. (1999) 'Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment', *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(8), pp. 342–349. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01363-2](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01363-2).

Iozzo, R.V. and Sanderson, R.D. (2011) 'Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(5), pp. 1013–1031. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x>.

Iwaisako, K. *et al.* (2014) 'Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(32), pp. E3297–E3305. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1400062111>.

Jackson, A.L. *et al.* (2006) 'Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing', *RNA*, 12(7), pp. 1197–1205. Available at: <https://doi.org/10.1261/rna.30706>.

Jaeschke, H. *et al.* (2002) 'Mechanisms of hepatotoxicity', *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 65(2), pp. 166–176. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.166>.

Jazayeri, A., Andrews, S.P. and Marshall, F.H. (2017) 'Structurally Enabled Discovery of Adenosine A2A Receptor Antagonists', *Chemical Reviews*, 117(1), pp. 21–37. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00119>.

Ji, J. *et al.* (2009) 'Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation', *FEBS letters*, 583(4), pp. 759–766. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.01.034>.

Jiang, M. *et al.* (2007) 'Nutlin-3 Protects Kidney Cells during Cisplatin Therapy by Suppressing Bax/Bak Activation', *Journal of Biological Chemistry*, 282(4), pp. 2636–2645. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M606928200>.

Johnson, C.H. *et al.* (2012) 'Xenobiotic Metabolomics: Major Impact on the Metabolome', *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, pp. 37–56. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134748>.

Jonas, S. and Izaurralde, E. (2015) 'Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing', *Nature Reviews. Genetics*, 16(7), pp. 421–433. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg3965>.

Juliano, R.L. and Ling, V. (1976) 'A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 455(1), pp. 152–162. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7).

Kadler, K.E. *et al.* (2007) 'Collagens at a glance', *Journal of Cell Science*, 120(12), pp. 1955–1958. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.03453>.

Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009) 'The basics of epithelial-mesenchymal transition', *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), pp. 1420–1428. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

Kamiya, Y., Miyazono, K. and Miyazawa, K. (2010) 'Smad7 Inhibits Transforming Growth Factor- $\beta$  Family Type I Receptors through Two Distinct Modes of Interaction', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(40), pp. 30804–30813. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166140>.

Kaur, T. *et al.* (2016) 'Adenosine A1 Receptor Protects Against Cisplatin Ototoxicity by Suppressing the NOX3/STAT1 Inflammatory Pathway in the Cochlea', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(14), pp. 3962–3977. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3111-15.2016>.

Kavsak, P. *et al.* (2000) 'Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation', *Molecular Cell*, 6(6), pp. 1365–1375. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00134-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00134-9).

Kawano, Y. *et al.* (2012) 'Caffeine increases the antitumor effect of Cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 35(3), pp. 400–407. Available at: <https://doi.org/10.1248/bpb.35.400>.

Kelland, L.R. (2000) 'Preclinical perspectives on platinum resistance', *Drugs*, 59 Suppl 4, pp. 1–8; discussion 37–38. Available at: <https://doi.org/10.2165/00003495-200059004-00001>.

Kelley, S.L. *et al.* (1988) 'Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs', *Science (New York, N.Y.)*, 241(4874), pp. 1813–1815. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.3175622>.

Khodayar, M.J. *et al.* (2014) 'The Preventive Effect of Atorvastatin on Paraquat-Induced Pulmonary Fibrosis in the Rats', *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(4), pp. 345–349. Available at: <https://doi.org/10.5681/apb.2014.050>.

Khokha, R., Murthy, A. and Weiss, A. (2013) 'Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity', *Nature Reviews. Immunology*, 13(9), pp. 649–665. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3499>.

Kim, D., Langmead, B. and Salzberg, S.L. (2015) 'HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements', *Nature Methods*, 12(4), pp. 357–360. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>.

Kim, D.-G. and Bynoe, M.S. (2016) 'A2A adenosine receptor modulates drug efflux transporter P-glycoprotein at the blood-brain barrier', *The Journal of Clinical Investigation*, 126(5), pp. 1717–1733. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI76207>.

Kim, D.H. *et al.* (2015) '4-Hydroxynonenal: A Superior Oxidative Biomarker Compared to Malondialdehyde and Carbonyl Content Induced by Carbon Tetrachloride in Rats', *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 78(16), pp. 1051–1062. Available at: <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1067505>.

Kim, R.B. (2002) 'Transporters and xenobiotic disposition', *Toxicology*, 181–182, pp. 291–297. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00296-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00296-2).

Kimura, T. (2020) '[Non-coding Natural Antisense RNA: Mechanisms of Action in the Regulation of Target Gene Expression and Its Clinical Implications]', *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 140(5), pp. 687–700. Available at: <https://doi.org/10.1248/yakushi.20-00002>.

Kimura, Y. *et al.* (2007) 'Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1', *Cancer Science*, 98(9), pp. 1303–1310. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00538.x>.

Kinirons, M.T. and O'Mahony, M.S. (2004) 'Drug metabolism and ageing', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57(5), p. 540. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02096.x>.

- Kirkness, M.W., Lehmann, K. and Forde, N.R. (2019) 'Mechanics and structural stability of the collagen triple helix', *Current Opinion in Chemical Biology*, 53, pp. 98–105. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.08.001>.
- Kisseleva, T. (2017) 'The Origin of Fibrogenic Myofibroblasts in Fibrotic Liver', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 65(3), pp. 1039–1043. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.28948>.
- Klingenberg, M. (1958) 'Pigments of rat liver microsomes', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75(2), pp. 376–386. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90436-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90436-3).
- Knauss, J.L., Bian, S. and Sun, T. (2013) 'Plasmid-based target protectors allow specific blockade of miRNA silencing activity in mammalian developmental systems', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, p. 163. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00163>.
- Knight, K.R.G., Kraemer, D.F. and Neuwelt, E.A. (2005) 'Ototoxicity in Children Receiving Platinum Chemotherapy: Underestimating a Commonly Occurring Toxicity That May Influence Academic and Social Development', *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), pp. 8588–8596. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.00.5355>.
- Knight, R. j. *et al.* (1991) 'Amelioration of cisplatin-induced acute renal failure with 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine', *British Journal of Pharmacology*, 104(4), pp. 1062–1068. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12550.x>.
- Knijn, N. *et al.* (2011) 'The effect of prophylactic calcium and magnesium infusions on the incidence of neurotoxicity and clinical outcome of oxaliplatin-based systemic treatment in advanced colorectal cancer patients', *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 47(3), pp. 369–374. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.10.006>.
- Köberle, B. *et al.* (2010) 'Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1806(2), pp. 172–182. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.004>.
- Kolahdouzan, M. and Hamadeh, M.J. (2017) 'The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases', *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23(4), pp. 272–290. Available at: <https://doi.org/10.1111/cns.12684>.
- Koller, E. *et al.* (2011) 'Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes', *Nucleic Acids Research*, 39(11), pp. 4795–4807. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr089>.
- Konyn, P., Ahmed, A. and Kim, D. (2021) 'Current epidemiology in hepatocellular carcinoma', *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 15(11), pp. 1295–1307. Available at: <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1991792>.
- Koporec, K.P. *et al.* (1995) 'Effect of oral dosing vehicles on the subchronic hepatotoxicity of carbon tetrachloride in the rat', *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 44(1), pp. 13–27. Available at: <https://doi.org/10.1080/15287399509531940>.
- Kosmehl, H., Berndt, A. and Katenkamp, D. (1996) 'Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects', *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 429(6), pp. 311–322. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00198435>.
- Kossakowska, A.E. *et al.* (1998) 'Altered Balance Between Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Experimental Biliary Fibrosis', *The American Journal of Pathology*, 153(6), pp. 1895–1902.

- Koyama, Y. and Brenner, D.A. (2017) 'Liver inflammation and fibrosis', *The Journal of Clinical Investigation*, 127(1), pp. 55–64. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI88881>.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M. and Griffiths-Jones, S. (2019) 'miRBase: from microRNA sequences to function', *Nucleic Acids Research*, 47(Database issue), p. D155. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2011) 'miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data', *Nucleic Acids Research*, 39(suppl\_1), pp. D152–D157. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>.
- Krizhanovsky, V. *et al.* (2008) 'Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis', *Cell*, 134(4), pp. 657–667. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007) 'Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death', *Physiological Reviews*, 87(1), pp. 99–163. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>.
- Kruse, M.-N. *et al.* (2004) 'Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors.', *Biochemical Journal*, 378(Pt 2), pp. 383–389. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20031163>.
- Krützfeldt, J. *et al.* (2005) 'Silencing of microRNAs in vivo with "antagomirs"', *Nature*, 438(7068), pp. 685–689. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04303>.
- Kuhlmann, M.K., Burkhardt, G. and Köhler, H. (1997) 'Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application', *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 12(12), pp. 2478–2480. Available at: <https://doi.org/10.1093/ndt/12.12.2478>.
- Kukongviriyapan, V. *et al.* (2006) 'Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2', *Xenobiotica*, 36(1), pp. 15–28. Available at: <https://doi.org/10.1080/00498250500489901>.
- Kumarswamy, R., Volkman, I. and Thum, T. (2011) 'Regulation and function of miRNA-21 in health and disease', *RNA biology*, 8(5), pp. 706–713. Available at: <https://doi.org/10.4161/rna.8.5.16154>.
- Kurutas, E.B. (2016) 'The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state', *Nutrition Journal*, 15(1), p. 71. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>.
- Lai, M. and Afdhal, N.H. (2019) 'Liver Fibrosis Determination', *Gastroenterology Clinics of North America*, 48(2), pp. 281–289. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2019.02.002>.
- Lam, A.P. *et al.* (2011) 'Nuclear  $\beta$ -Catenin Is Increased in Systemic Sclerosis Pulmonary Fibrosis and Promotes Lung Fibroblast Migration and Proliferation', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(5), pp. 915–922. Available at: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0113OC>.
- Larouche, J. *et al.* (2018) 'Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets', *Advances in Wound Care*, 7(7), pp. 209–231. Available at: <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0761>.

- Larrue, R. *et al.* (2022) 'The Versatile Role of miR-21 in Renal Homeostasis and Diseases', *Cells*, 11(21), p. 3525. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells11213525>.
- Lassailly, G. *et al.* (2020) 'Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis', *Gastroenterology*, 159(4), pp. 1290-1301.e5. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.006>.
- Latcha, S. *et al.* (2016) 'Long-Term Renal Outcomes after Cisplatin Treatment', *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 11(7), pp. 1173–1179. Available at: <https://doi.org/10.2215/CJN.08070715>.
- Latella, G. and Rieder, F. (2017) 'Intestinal fibrosis: Ready to be Reversed', *Current opinion in gastroenterology*, 33(4), pp. 239–245. Available at: <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000363>.
- LeBleu, V.S., MacDonald, B. and Kalluri, R. (2007) 'Structure and Function of Basement Membranes', *Experimental Biology and Medicine*, 232(9), pp. 1121–1129. Available at: <https://doi.org/10.3181/0703-MR-72>.
- Lee, C.Y. *et al.* (2012) 'Farnesoid X Receptor Protects Hepatocytes From Injury by Repressing miR-199a-3p, Which Increases Levels of LKB1', *Gastroenterology*, 142(5), pp. 1206-1217.e7. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.007>.
- Lee, E.C. *et al.* (2019) 'Discovery and preclinical evaluation of anti-miR-17 oligonucleotide RGLS4326 for the treatment of polycystic kidney disease', *Nature Communications*, 10(1), p. 4148. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11918-y>.
- Lee, M.K. *et al.* (2007) 'TGF- $\beta$  activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA', *The EMBO Journal*, 26(17), pp. 3957–3967. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601818>.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) 'The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14', *Cell*, 75(5), pp. 843–854. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).
- Lee, W.M. (2017) 'Public Health: Acetaminophen (APAP) Hepatotoxicity—Isn't It Time for APAP to Go Away?', *Journal of hepatology*, 67(6), pp. 1324–1331. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.07.005>.
- Lee, Y.A., Wallace, M.C. and Friedman, S.L. (2015) 'Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story', *Gut*, 64(5), pp. 830–841. Available at: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306842>.
- Lei, L. *et al.* (2022) 'Portal fibroblasts with mesenchymal stem cell features form a reservoir of proliferative myofibroblasts in liver fibrosis', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 76(5), pp. 1360–1375. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.32456>.
- Leopold, P.L., Vincent, J. and Wang, H. (2012) 'A comparison of epithelial-to-mesenchymal transition and re-epithelialization', *Seminars in Cancer Biology*, 22(5–6), pp. 471–483. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2012.07.003>.
- Li, B. and Dewey, C.N. (2011) 'RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome', *BMC Bioinformatics*, 12, p. 323. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>.

- Li, C. *et al.* (2002) 'Wnt5a Participates in Distal Lung Morphogenesis', *Developmental Biology*, 248(1), pp. 68–81. Available at: <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0729>.
- Li, J. *et al.* (2014a) 'The validity of serum markers for fibrosis staging in chronic hepatitis B and C', *Journal of Viral Hepatitis*, 21(12), pp. 930–937. Available at: <https://doi.org/10.1111/jvh.12224>.
- Li and Han (2014b) 'Profibrotic effect of miR-33a with Akt activation in hepatic stellate cells', *Cellular Signalling*, 26(1), pp. 141–148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.09.018>.
- Li, J. and Liu, C. (2019) 'Coding or Noncoding, the Converging Concepts of RNAs', *Frontiers in Genetics*, 10, p. 496. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00496>.
- Li, M. *et al.* (2020) 'Sirt3 modulates fatty acid oxidation and attenuates cisplatin-induced AKI in mice', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(9), pp. 5109–5121. Available at: <https://doi.org/10.1111/jcmm.15148>.
- Li, M. *et al.* (2021b) 'Icaritin Inhibits Skin Fibrosis through Regulating AMPK and Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling', *Cell Biochemistry and Biophysics*, 79(2), pp. 231–238. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00952-z>.
- Li, M.A. and He, L. (2012) 'microRNAs as novel regulators of stem cell pluripotency and somatic cell reprogramming', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 34(8), pp. 670–680. Available at: <https://doi.org/10.1002/bies.201200019>.
- Li, W. *et al.* (2021a) 'HBV induces liver fibrosis via the TGF- $\beta$ 1/miR-21-5p pathway', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(2), p. 169. Available at: <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9600>.
- Li, W.-Q. *et al.* (2011) 'The rno-miR-34 family is upregulated and targets ACSL1 in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats', *The FEBS Journal*, 278(9), pp. 1522–1532. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08075.x>.
- Li, X., Wei, Y. and Wang, Z. (2018) 'microRNA-21 and hypertension', *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 41(9), pp. 649–661. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0071-z>.
- Li, Y. *et al.* (2019) 'MiR-199a-5p suppresses non-small cell lung cancer via targeting MAP3K11', *Journal of Cancer*, 10(11), pp. 2472–2479. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.29426>.
- Li, Z. *et al.* (2007) 'Transforming growth factor-beta and substrate stiffness regulate portal fibroblast activation in culture', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(4), pp. 1246–1256. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.21792>.
- Liedtke, C. *et al.* (2013) 'Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects', *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 6, p. 19. Available at: <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-19>.
- Lin, C.-H., Wang, W.-C. and Kao, S.-H. (2014) 'Der p 2 promotes motility of airway epithelial cell attributing to AKT/GSK3 $\beta$ -associated epithelial-to-mesenchymal transition', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 395(1–2), pp. 135–143. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2119-y>.
- Lin, J.H. and Lu, A.Y.H. (1998) 'Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications':, *Clinical Pharmacokinetics*, 35(5), pp. 361–390. Available at: <https://doi.org/10.2165/00003088-199835050-00003>.

Lin, Z. *et al.* (2019) 'MicroRNA-130a controls bone marrow mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblastic and adipogenic fate', *Cell Proliferation*, 52(6), p. e12688. Available at: <https://doi.org/10.1111/cpr.12688>.

Lino Cardenas, C.L. *et al.* (2013) 'miR-199a-5p Is Upregulated during Fibrogenic Response to Tissue Injury and Mediates TGFbeta-Induced Lung Fibroblast Activation by Targeting Caveolin-1', *PLoS Genetics*. Edited by H.S. Scott, 9(2), p. e1003291. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003291>.

Liu, G. *et al.* (2010) 'miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis', *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8), pp. 1589–1597. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20100035>.

Liu, H. *et al.* (2017a) 'A novel lnc-PCF promotes the proliferation of TGF- $\beta$ 1-activated epithelial cells by targeting miR-344a-5p to regulate map3k11 in pulmonary fibrosis', *Cell Death & Disease*, 8(10), p. e3137. Available at: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.500>.

Liu, H. and Baliga, R. (2003) 'Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis', *Kidney International*, 63(5), pp. 1687–1696. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00908.x>.

Liu, J. *et al.* (2017b) 'miR199a-3p regulates P53 by targeting CABLES1 in mouse cardiac c-kit+ cells to promote proliferation and inhibit apoptosis through a negative feedback loop', *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), p. 127. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0515-4>.

Liu, N. *et al.* (2019) 'Isorhamnetin Inhibits Liver Fibrosis by Reducing Autophagy and Inhibiting Extracellular Matrix Formation via the TGF- $\beta$ 1/Smad3 and TGF- $\beta$ 1/p38 MAPK Pathways', *Mediators of Inflammation*, 2019, p. 6175091. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/6175091>.

Liu, T. *et al.* (2021) 'Noncanonical Wnt Signaling Promotes Myofibroblast Differentiation in Pulmonary Fibrosis', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 65(5), pp. 489–499. Available at: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0499OC>.

Liu, Y. (2011) 'Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis', *Nature Reviews. Nephrology*, 7(12), pp. 684–696. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.149>.

Liu, Ying *et al.* (2022b) 'MicroRNA-122-5p promotes renal fibrosis and injury in spontaneously hypertensive rats by targeting FOXO3', *Experimental Cell Research*, 411(2), p. 113017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113017>.

Liu, Yirong *et al.* (2022a) 'MiR-122-5p promotes peritoneal fibrosis in a rat model of peritoneal dialysis by targeting Smad5 to activate Wnt/ $\beta$ -catenin pathway', *Renal Failure*, 44(1), pp. 191–203. Available at: <https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2030360>.

Liu, Y.-J. *et al.* (2019) 'Research progress on adenosine in central nervous system diseases', *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(9), pp. 899–910. Available at: <https://doi.org/10.1111/cns.13190>.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp. 402–408. Available at: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Londos, C., Cooper, D.M. and Wolff, J. (1980) 'Subclasses of external adenosine receptors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(5), pp. 2551–2554. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2551>.

Lowenthal, R.M. and Eaton, K. (1996) 'TOXICITY OF CHEMOTHERAPY', *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 10(4), pp. 967–990. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70378-6](https://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70378-6).

Lu, J., Xie, L. and Sun, S. (2021) 'The inhibitor miR-21 regulates macrophage polarization in an experimental model of chronic obstructive pulmonary disease', *Tobacco Induced Diseases*, 19, p. 69. Available at: <https://doi.org/10.18332/tid/140095>.

Lu, P. *et al.* (2011) 'Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), p. a005058. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>.

Lu, T.X. and Rothenberg, M.E. (2018) 'MicroRNA', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141(4), pp. 1202–1207. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>.

Lu, Y. and Cederbaum, A.I. (2006) 'Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Is Enhanced by Elevated Expression of Cytochrome P450 2E1', *Toxicological Sciences*, 89(2), pp. 515–523. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj031>.

Lv, Q. *et al.* (2020) 'Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis in vitro and in vivo through regulating Wnt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathways', *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 26(1), p. 49. Available at: <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00173-3>.

Lynch, M.D. and Watt, F.M. (2018) 'Fibroblast heterogeneity: implications for human disease', *The Journal of Clinical Investigation*, 128(1), pp. 26–35. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI93555>.

Lynch, T. and Price, A. (2007) 'The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects', *American Family Physician*, 76(3), pp. 391–396.

MacKenna, D. (2000) 'Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis', *Cardiovascular Research*, 46(2), pp. 257–263. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00030-4).

Maffioletti, P.-F. (2015) 'Le pamplemousse, un célèbre inhibiteur enzymatique', *Actualités Pharmaceutiques*, 54(544), pp. 45–48. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2014.12.016>.

Magni, G. and Ceruti, S. (2020) 'Adenosine Signaling in Autoimmune Disorders', *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(9), p. E260. Available at: <https://doi.org/10.3390/ph13090260>.

Mahdavian Delavary, B. *et al.* (2011) 'Macrophages in skin injury and repair', *Immunobiology*, 216(7), pp. 753–762. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.01.001>.

Makni, M. *et al.* (2012) 'Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and DNA damage in rats: protective role of vanillin', *Human & Experimental Toxicology*, 31(8), pp. 844–852. Available at: <https://doi.org/10.1177/0960327111429140>.

Makovec, T. (2019) 'Cisplatin and Beyond: Molecular Mechanisms of Action and Drug Resistance Development in Cancer Chemotherapy', *Radiology and Oncology*, 53(2), pp. 148–158. Available at: <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>.

- Mallat, A. and Lotersztajn, S. (2009) '[Liver fibrosis: from pathophysiology to therapeutic openings]', *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*, 33(8–9), pp. 789–798. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gcb.2009.05.004>.
- Mandic, A. *et al.* (2003) 'Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp. 9100–9106. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M210284200>.
- Manibusan, M.K., Odin, M. and Eastmond, D.A. (2007) 'Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review', *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 25(3), pp. 185–209. Available at: <https://doi.org/10.1080/10590500701569398>.
- Manikandan, P. and Nagini, S. (2018) 'Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review', *Current Drug Targets*, 19(1). Available at: <https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>.
- Manohar, S. and Leung, N. (2018) 'Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature', *Journal of Nephrology*, 31(1), pp. 15–25. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0392-z>.
- Marcellin, P. *et al.* (2013) 'Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study', *Lancet (London, England)*, 381(9865), pp. 468–475. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61425-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61425-1).
- Marcellin, P. and Kutala, B.K. (2018) 'Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening', *Liver International*, 38(S1), pp. 2–6. Available at: <https://doi.org/10.1111/liv.13682>.
- Martin, C. *et al.* (2000) 'Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein', *Molecular Pharmacology*, 58(3), pp. 624–632. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.58.3.624>.
- Martin, P. (1997) 'Wound healing--aiming for perfect skin regeneration', *Science (New York, N.Y.)*, 276(5309), pp. 75–81. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.75>.
- Martin, P. and Leibovich, S.J. (2005) 'Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly', *Trends in Cell Biology*, 15(11), pp. 599–607. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.002>.
- Martinez, J. *et al.* (2002) 'Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi', *Cell*, 110(5), pp. 563–574. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00908-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00908-x).
- Matsui, M. and Corey, D.R. (2017) 'Non-coding RNAs as drug targets', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(3), pp. 167–179. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.117>.
- McManus, M.T. (2003) 'MicroRNAs and cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 13(4), pp. 253–258. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1044-579x\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/s1044-579x(03)00038-5).
- Mederacke, I. *et al.* (2013) 'Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology', *Nature Communications*, 4, p. 2823. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms3823>.

- Mendell, J.R. *et al.* (2016) 'Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy', *Annals of Neurology*, 79(2), pp. 257–271. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.24555>.
- Meng, X., Nikolic-Paterson, D.J. and Lan, H.Y. (2016) 'TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis', *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), pp. 325–338. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>.
- Meng, X.M. *et al.* (2010) 'Smad2 Protects against TGF- $\beta$ /Smad3-Mediated Renal Fibrosis', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(9), pp. 1477–1487. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2009121244>.
- Merkt, W. *et al.* (2021) 'Myofibroblast fate plasticity in tissue repair and fibrosis: Deactivation, apoptosis, senescence and reprogramming', *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 29(4), pp. 678–691. Available at: <https://doi.org/10.1111/wrr.12952>.
- Michelfelder, S. and Trepel, M. (2009) 'Chapter 2 - Adeno-Associated Viral Vectors and Their Redirection to Cell-Type Specific Receptors', in *Advances in Genetics*. Academic Press (Tissue-Specific Vascular Endothelial Signals and Vector Targeting, Part A), pp. 29–60. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(09\)67002-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(09)67002-4).
- Miller, R.P. *et al.* (2010) 'Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity', *Toxins*, 2(11), pp. 2490–2518. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins2112490>.
- Minchinton, A.I. and Tannock, I.F. (2006) 'Drug penetration in solid tumours', *Nature Reviews. Cancer*, 6(8), pp. 583–592. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc1893>.
- Moggs, J.G. *et al.* (1997) 'Differential Human Nucleotide Excision Repair of Paired and Mismatched Cisplatin-DNA Adducts', *Nucleic Acids Research*, 25(3), pp. 480–490. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/25.3.480>.
- Moon, H. *et al.* (2019) 'High Risk of Hepatocellular Carcinoma Development in Fibrotic Liver: Role of the Hippo-YAP/TAZ Signaling Pathway', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), p. 581. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20030581>.
- Morelli, E. *et al.* (2018) 'Therapeutic vulnerability of multiple myeloma to MIR17PTi, a first-in-class inhibitor of pri-miR-17-92', *Blood*, 132(10), pp. 1050–1063. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-836601>.
- Motohashi, H. and Inui, K. (2013) 'Organic cation transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney', *The AAPS journal*, 15(2), pp. 581–588. Available at: <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9465-7>.
- Murakami, T. and Takano, M. (2008) 'Intestinal efflux transporters and drug absorption', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(7), pp. 923–939. Available at: <https://doi.org/10.1517/17425255.4.7.923>.
- Murphy-Ullrich, J.E. and Suto, M.J. (2018) 'Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- $\beta$  activation: a therapeutic target for fibrotic disease', *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 68–69, pp. 28–43. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.009>.

- Nagashima, K., Kusaka, H. and Karasawa, A. (1995) 'Protective effects of KW-3902, an adenosine A1-receptor antagonist, against cisplatin-induced acute renal failure in rats', *Japanese Journal of Pharmacology*, 67(4), pp. 349–357. Available at: <https://doi.org/10.1254/jjp.67.349>.
- Naomi, R., Ridzuan, P.M. and Bahari, H. (2021) 'Current Insights into Collagen Type I', *Polymers*, 13(16), p. 2642. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym13162642>.
- Nasim, F., Sabath, B.F. and Eapen, G.A. (2019) 'Lung Cancer', *Medical Clinics of North America*, 103(3), pp. 463–473. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.006>.
- Nebert, D.W. and Gonzalez, F.J. (1987) 'P450 genes: structure, evolution, and regulation', *Annual Review of Biochemistry*, 56, pp. 945–993. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.004501>.
- Nebert, D.W. and Russell, D.W. (2002) 'Clinical importance of the cytochromes P450', *The Lancet*, 360(9340), pp. 1155–1162. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7).
- Nelson, D.R. *et al.* (1993) 'The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature', *DNA and cell biology*, 12(1), pp. 1–51. Available at: <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.1>.
- Nelson, D.R. *et al.* (1996) 'P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature', *Pharmacogenetics*, 6(1), pp. 1–42. Available at: <https://doi.org/10.1097/00008571-199602000-00002>.
- Newby, A.C. (1984) 'Adenosine and the concept of "retaliatory metabolites"', *Trends in Biochemical Sciences*, 9(2), pp. 42–44. Available at: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(84\)90176-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90176-2).
- Nickel, J., Ten Dijke, P. and Mueller, T.D. (2018) 'TGF- $\beta$ ; family co-receptor function and signaling', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), pp. 12–36. Available at: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx126>.
- Nicotera, P., Bellomo, G. and Orrenius, S. (1992) 'Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32, pp. 449–470. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.32.040192.002313>.
- Nieto, N. *et al.* (2001) 'Rat hepatic stellate cells contribute to the acute-phase response with increased expression of alpha1(I) and alpha1(IV) collagens, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and matrix-metalloproteinase-2 messenger RNAs', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(3), pp. 597–607. Available at: <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22520>.
- Nozu, K. *et al.* (2019) 'A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome', *Clinical and Experimental Nephrology*, 23(2), pp. 158–168. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10157-018-1629-4>.
- Nyberg, K.A. *et al.* (2002) 'Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints', *Annual Review of Genetics*, 36, pp. 617–656. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.060402.113540>.
- Obad, S. *et al.* (2011) 'Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs', *Nature Genetics*, 43(4), pp. 371–378. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.786>.

O'Connor *et al.* (2000) 'Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells', *The American journal of pathology*, 156(2). Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64742-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64742-6).

Oda, Y., Hidaka, M. and Suzuki, A. (2017) 'Caffeine Has a Synergistic Anticancer Effect with Cisplatin via Inhibiting Fanconi Anemia Group D2 Protein Monoubiquitination in Hepatocellular Carcinoma Cells', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 40(11), pp. 2005–2009. Available at: <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00457>.

Ohta, A. *et al.* (2006) 'A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), pp. 13132–13137. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>.

Oliveros, A. *et al.* (2022) 'Adenosine A2A receptor blockade prevents cisplatin-induced impairments in neurogenesis and cognitive function', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(28), p. e2206415119. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2206415119>.

Orhan, H. (2021) 'Biotransformation of Drugs and other Xenobiotics as Key Modulator of Toxicity', *Current Drug Metabolism*, 22(8), pp. 582–583. Available at: <https://doi.org/10.2174/138920022208210915160901>.

Ørom, U.A., Nielsen, F.C. and Lund, A.H. (2008) 'MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation', *Molecular Cell*, 30(4), pp. 460–471. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>.

Oun, R., Moussa, Y.E. and Wheate, N.J. (2018) 'The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists', *Dalton Transactions*, 47(19), pp. 6645–6653. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>.

Pabla, N. and Dong, Z. (2008) 'Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies', *Kidney International*, 73(9), pp. 994–1007. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002786>.

Pakshir, P. *et al.* (2020) 'The myofibroblast at a glance', *Journal of Cell Science*, 133(13), p. jcs227900. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.227900>.

Pal, R. *et al.* (2021) 'Reactive metabolites of the anticonvulsant drugs and approaches to minimize the adverse drug reaction', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 226, p. 113890. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113890>.

Pan, B. *et al.* (2021) 'Indoleamine-2,3-Dioxygenase Activates Wnt/ $\beta$ -Catenin Inducing Kidney Fibrosis after Acute Kidney Injury', *Gerontology*, 67(5), pp. 611–619. Available at: <https://doi.org/10.1159/000515041>.

Panni, S. *et al.* (2020) 'Non-coding RNA regulatory networks', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1863(6), p. 194417. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194417>.

Park, B.K. *et al.* (2005) 'The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, pp. 177–202. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100058>.

Parola, M. and Pinzani, M. (2019) 'Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues', *Molecular Aspects of Medicine*, 65, pp. 37–55. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>.

Patel, V. and Noureddine, L. (2012) 'MicroRNAs and fibrosis', *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 21(4), pp. 410–416. Available at: <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328354e559>.

Patten, J. and Wang, K. (2021) 'Fibronectin in development and wound healing', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, pp. 353–368. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.09.005>.

Paulsson, M. (1992) 'Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions', *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 27(1–2), pp. 93–127. Available at: <https://doi.org/10.3109/10409239209082560>.

Pelkonen, O. *et al.* (2008) 'Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status', *Archives of Toxicology*, 82(10), pp. 667–715. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0332-8>.

Pellicoro, A. *et al.* (2014) 'Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ', *Nature Reviews. Immunology*, 14(3), pp. 181–194. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3623>.

Peres, L.A.B. and da Cunha, A.D. (2013) 'Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms', *Jornal Brasileiro De Nefrologia: 'Orgao Oficial De Sociedades Brasileira E Latino-Americana De Nefrologia*, 35(4), pp. 332–340. Available at: <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130052>.

Peter Guengerich, F., Waterman, M.R. and Egli, M. (2016) 'Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function', *Trends in pharmacological sciences*, 37(8), pp. 625–640. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>.

Petrovic, M. and Todorovic, D. (2016) 'BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF CISPLATIN IN CANCER CELLS', in. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/BIOCHEMICAL-AND-MOLECULAR-MECHANISMS-OF-ACTION-OF-Petrovic-Todorovic/81413e2d79c305d30ec3c9e085f5756f77592c9e> (Accessed: 2 January 2023).

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

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

Popović, D. *et al.* (2019) 'Anthocyanins Protect Hepatocytes against CCl<sub>4</sub>-Induced Acute Liver Injury in Rats by Inhibiting Pro-inflammatory mediators, Polyamine Catabolism, Lipocalin-2, and Excessive Proliferation of Kupffer Cells', *Antioxidants*, 8(10), p. 451. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox8100451>.

Pottier, N. *et al.* (2014) 'FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs', *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(3), pp. 119–126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.01.003>.

Préaux, A.-M. *et al.* (1999) 'Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell-matrix interactions: Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Human Hepatic Fibrosis

Regulation by Cell-Matrix Interactions', *Hepatology*, 30(4), pp. 944–950. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.510300432>.

Pushpakom, S. *et al.* (2019) 'Drug repurposing: progress, challenges and recommendations', *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), pp. 41–58. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.

Quintanilha, J.C.F. *et al.* (2017) 'Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 80(2), pp. 223–233. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3358-x>.

Rajput, S.K., Singh, J.N. and Sharma, S.S. (2010) 'Evaluation of terfenadine and ketoconazole-induced QT prolongation in conscious telemetered guinea pigs', *Pharmacological Reports*, 62(4), pp. 683–688. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70325-X](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70325-X).

Ralevic, V. and Burnstock, G. (1991) 'Effects of purines and pyrimidines on the rat mesenteric arterial bed', *Circulation Research*, 69(6), pp. 1583–1590. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.res.69.6.1583>.

Ramachandran, A. and Jaeschke, H. (2018) 'Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives', *Gene Expression*, 18(1), pp. 19–30. Available at: <https://doi.org/10.3727/105221617X15084371374138>.

Ramesh, G. and Reeves, W.B. (2004) 'Inflammatory cytokines in acute renal failure', *Kidney International. Supplement*, (91), pp. S56–61. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.09109.x>.

Rani, V. and Sengar, R.S. (2022) 'Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation', *Biotechnology and Bioengineering*, 119(3), pp. 685–692. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.28029>.

Ravichandra, A. and Schwabe, R.F. (2021) 'Mouse Models of Liver Fibrosis', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2299, pp. 339–356. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1382-5\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1382-5_23).

Rebillard, A., Lagadic-Gossmann, D. and Dimanche-Boitrel, M.-T. (2008) 'Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets', *Current Medicinal Chemistry*, 15(26), pp. 2656–2663. Available at: <https://doi.org/10.2174/092986708786242903>.

Reiss, A.B. *et al.* (2019) 'Adenosine and the Cardiovascular System', *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions*, 19(5), pp. 449–464. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40256-019-00345-5>.

Rendic, S. (2002) 'Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data', *Drug Metabolism Reviews*, 34(1–2), pp. 83–448. Available at: <https://doi.org/10.1081/dmr-120001392>.

Rendic, S. and Guengerich, F.P. (2015) 'Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals', *Chemical Research in Toxicology*, 28(1), pp. 38–42. Available at: <https://doi.org/10.1021/tx500444e>.

Reuben, A., Koch, D.G. and Lee, W.M. (2010) 'Drug-induced acute liver failure: Results of a U.S. multicenter, prospective study', *Hepatology*, 52(6), pp. 2065–2076. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.23937>.

- Rifkin, D.B. (2005) 'Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), pp. 7409–7412. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.R400029200>.
- Ro, S. *et al.* (2007) 'Tissue-dependent paired expression of miRNAs', *Nucleic Acids Research*, 35(17), pp. 5944–5953. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm641>.
- Roberts, A.B. *et al.* (1981) 'New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9), pp. 5339–5343. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5339>.
- Robinson, E.K., Covarrubias, S. and Carpenter, S. (2020) 'The how and why of lncRNA function: An innate immune perspective', *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1863(4), p. 194419. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194419>.
- Rock, J.R. *et al.* (2011) 'Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), pp. E1475-1483. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1117988108>.
- Rock, K.L. and Kono, H. (2008) 'The inflammatory response to cell death', *Annual review of pathology*, 3, pp. 99–126. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456>.
- Rockey, D.C. (2001) 'Hepatic Blood Flow Regulation by Stellate Cells in Normal and Injured Liver', *Seminars in Liver Disease*, 21(03), pp. 337–350. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2001-17551>.
- Roderburg, C. *et al.* (2011) 'Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis', *Hepatology*, 53(1), pp. 209–218. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.23922>.
- Rodero, M.P. *et al.* (2014) 'In vivo imaging reveals a pioneer wave of monocyte recruitment into mouse skin wounds', *PloS One*, 9(10), p. e108212. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108212>.
- Roehlen, N., Crouchet, E. and Baumert, T.F. (2020) 'Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives', *Cells*, 9(4), p. 875. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9040875>.
- van Rooij, E. *et al.* (2007) 'Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA', *Science (New York, N.Y.)*, 316(5824), pp. 575–579. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1139089>.
- van Rooij, E. *et al.* (2008) 'Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), pp. 13027–13032. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0805038105>.
- van Rooij, E. and Kauppinen, S. (2014) 'Development of microRNA therapeutics is coming of age', *EMBO Molecular Medicine*, 6(7), pp. 851–864. Available at: <https://doi.org/10.15252/emmm.201100899>.
- van Rooij, E., Marshall, W.S. and Olson, E.N. (2008) 'Toward MicroRNA-Based Therapeutics for Heart Disease - the sense in antisense', *Circulation research*, 103(9), pp. 919–928. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183426>.

- Rosenberg, B., Vancamp, L. and Krigas, T. (1965) 'INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE', *Nature*, 205, pp. 698–699. Available at: <https://doi.org/10.1038/205698a0>.
- Rosenberg, W.M.C. *et al.* (2004) 'Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study', *Gastroenterology*, 127(6), pp. 1704–1713. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.08.052>.
- Rowe, R.G. *et al.* (2011) 'Hepatocyte-Derived Snail1 Propagates Liver Fibrosis Progression', *Molecular and Cellular Biology*, 31(12), pp. 2392–2403. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.01218-10>.
- Roy, S. *et al.* (2015) 'miR-30c and miR-193 are a part of the TGF- $\beta$ -dependent regulatory network controlling extracellular matrix genes in liver fibrosis: miR-193 and miR-30c in liver fibrosis', *Journal of Digestive Diseases*, 16(9), pp. 513–524. Available at: <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12266>.
- Roy, S.G., Nozaki, Y. and Phan, S.H. (2001) 'Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(7), pp. 723–734. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(01\)00041-3](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00041-3).
- Russo, F.P. *et al.* (2006) 'The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis', *Gastroenterology*, 130(6), pp. 1807–1821. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.036>.
- Russo, M.W. *et al.* (2004) 'Liver transplantation for acute liver failure from drug induced liver injury in the United States', *Liver Transplantation*, 10(8), pp. 1018–1023. Available at: <https://doi.org/10.1002/lt.20204>.
- Rybak, L.P. *et al.* (2007) 'Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention', *Hearing Research*, 226(1–2), pp. 157–167. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.09.015>.
- Saccomano, S.J. (2019) 'Acute acetaminophen toxicity in adults', *The Nurse Practitioner*, 44(11), pp. 42–47. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.NPR.0000586020.15798.c6>.
- Sachdeva, S. and Gupta, M. (2013) 'Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview', *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ*, 21(3), pp. 245–253. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.011>.
- Sadzuka, Y., Shimizu, Y. and Takino, Y. (1994) 'Role of glutathione S-transferase isoenzymes in cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat', *Toxicology Letters*, 70(2), pp. 211–222. Available at: [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(94\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0378-4274(94)90165-1).
- Saini, A. *et al.* (2022) 'Adenosine receptor antagonists: Recent advances and therapeutic perspective', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 227, p. 113907. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113907>.
- Saito, C., Zwingmann, C. and Jaeschke, H. (2010) 'Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(1), pp. 246–254. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.23267>.
- Samimi, G. *et al.* (2004) 'Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B', *Molecular Pharmacology*, 66(1), pp. 25–32. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.66.1.25>.

Sandrin, L. *et al.* (2003) 'Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis', *Ultrasound in Medicine & Biology*, 29(12), pp. 1705–1713. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2003.07.001>.

Sanzgiri, U.Y. *et al.* (1995) 'Effect of route and pattern of exposure on the pharmacokinetics and acute hepatotoxicity of carbon tetrachloride', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134(1), pp. 148–154. Available at: <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1178>.

Sato, M. *et al.* (2003) 'Targeted disruption of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction', *Journal of Clinical Investigation*, 112(10), pp. 1486–1494. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI200319270>.

Savary, G., Dewaeles, E., *et al.* (2019a) 'The Long Noncoding RNA DNMT3OS Is a Reservoir of FibromiRs with Major Functions in Lung Fibroblast Response to TGF- $\beta$  and Pulmonary Fibrosis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(2), pp. 184–198. Available at: <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1237OC>.

Savary, G., Pottier, N., *et al.* (2019b) '[The function of a long non coding RNA decoded in idiopathic pulmonary fibrosis]', *Medicine Sciences: M/S*, 35(10), pp. 739–742. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2019144>.

Savigne, J. *et al.* (2013) 'Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 24(3), pp. 364–375. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2012020148>.

Schindler, C.W. *et al.* (2005) 'Role of central and peripheral adenosine receptors in the cardiovascular responses to intraperitoneal injections of adenosine A1 and A2A subtype receptor agonists', *British Journal of Pharmacology*, 144(5), pp. 642–650. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706043>.

Schuppan, D. *et al.* (2018) 'Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies', *Matrix Biology*, 68–69, pp. 435–451. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.04.006>.

Schwab, D. *et al.* (2003) 'Comparison of in Vitro P-Glycoprotein Screening Assays: Recommendations for Their Use in Drug Discovery', *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(9), pp. 1716–1725. Available at: <https://doi.org/10.1021/jm021012t>.

Sears, S.M. and Siskind, L.J. (2021) 'Potential Therapeutic Targets for Cisplatin-Induced Kidney Injury: Lessons from Other Models of AKI and Fibrosis', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 32(7), pp. 1559–1567. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2020101455>.

Seliskar, M. and Rozman, D. (2007) 'Mammalian cytochromes P450—Importance of tissue specificity', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1770(3), pp. 458–466. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.016>.

Seto, A.G. *et al.* (2018) 'Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma', *British Journal of Haematology*, 183(3), pp. 428–444. Available at: <https://doi.org/10.1111/bjh.15547>.

Shadid, M., Badawi, M. and Abulrob, A. (2021) 'Antisense oligonucleotides: absorption, distribution, metabolism, and excretion', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 17(11), pp. 1281–1292. Available at: <https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1992382>.

Shah, A.G. *et al.* (2009) 'Comparison of Noninvasive Markers of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(10), pp. 1104–1112. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.05.033>.

Shah, N. and Dizon, D.S. (2009) 'New-generation platinum agents for solid tumors', *Future Oncology*, 5(1), pp. 33–42. Available at: <https://doi.org/10.2217/14796694.5.1.33>.

Shapiro, A.B. *et al.* (1999) 'Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site', *European Journal of Biochemistry*, 259(3), pp. 841–850. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00098.x>.

Sharom, F.J. (2008) 'ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance', *Pharmacogenomics*, 9(1), pp. 105–127. Available at: <https://doi.org/10.2217/14622416.9.1.105>.

Sheehy, E.J. *et al.* (2020) 'The Incorporation of Marine Coral Microparticles into Collagen-Based Scaffolds Promotes Osteogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells via Calcium Ion Signalling', *Marine Drugs*, 18(2), p. 74. Available at: <https://doi.org/10.3390/md18020074>.

Shen, X. and Corey, D.R. (2018) 'Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs', *Nucleic Acids Research*, 46(4), pp. 1584–1600. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239>.

Sheth, S. *et al.* (2014) 'Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), pp. 2024–2052. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms15022024>.

Shi, M. *et al.* (2011) 'Latent TGF- $\beta$  structure and activation', *Nature*, 474(7351), pp. 343–349. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature10152>.

Shi, M. *et al.* (2018) 'Cisplatin nephrotoxicity as a model of chronic kidney disease', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 98(8), pp. 1105–1121. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0063-2>.

Shoulders, M.D. and Raines, R.T. (2009) 'Collagen Structure and Stability', *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), pp. 929–958. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>.

Shustik, C., Dalton, W. and Gros, P. (1995) 'P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: biochemistry, clinical relevance and modulation', *Molecular Aspects of Medicine*, 16(1), pp. 1–78. Available at: [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(94\)00040-a](https://doi.org/10.1016/0098-2997(94)00040-a).

Si, M. and Lang, J. (2018) 'The roles of metallothioneins in carcinogenesis', *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), p. 107. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0645-x>.

Siddik, Z.H. (2003) 'Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance', *Oncogene*, 22(47), pp. 7265–7279. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>.

Siegel, T. and Haim, N. (1990) 'Cisplatin-induced peripheral neuropathy. Frequent off-therapy deterioration, demyelinating syndromes, and muscle cramps', *Cancer*, 66(6), pp. 1117–1123. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19900915\)66:6<1117::AID-CNCR2820660607>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19900915)66:6<1117::AID-CNCR2820660607>3.0.CO;2-O).

Sim, S.C. and Ingelman-Sundberg, M. (2013) 'Update on Allele Nomenclature for Human Cytochromes P450 and the Human Cytochrome P450 Allele (CYP-Allele) Nomenclature Database', in I.R. Phillips, E.A.

Shephard, and P.R. Ortiz de Montellano (eds) *Cytochrome P450 Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), pp. 251–259. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-321-3\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-321-3_21).

Singh, A.K. *et al.* (2022) 'Targeting the A3 adenosine receptor to prevent and reverse chemotherapy-induced neurotoxicities in mice', *Acta Neuropathologica Communications*, 10(1), p. 11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01315-w>.

Singh, P., Carraher, C. and Schwarzbauer, J.E. (2010) 'Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix', *Annual review of cell and developmental biology*, 26, pp. 397–419. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104020>.

Sitkovsky, M.V. *et al.* (2014) 'Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists', *Cancer Immunology Research*, 2(7), pp. 598–605. Available at: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0075>.

Slaviero, K.A., Clarke, S.J. and Rivory, L.P. (2003) 'Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy', *The Lancet Oncology*, 4(4), pp. 224–232. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)01034-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01034-9).

Smith, H.W. and Marshall, C.J. (2010) 'Regulation of cell signalling by uPAR', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(1), pp. 23–36. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2821>.

Socinski, M.A. *et al.* (2013) 'Treatment of Stage IV Non-small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines', *Chest*, 143(5, Supplement), pp. e341S-e368S. Available at: <https://doi.org/10.1378/chest.12-2361>.

Srinivasan, M. *et al.* (2005) 'Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity', *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 19(4), pp. 491–496. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2005.00332.x>.

Staff, N.P. *et al.* (2017) 'Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review', *Annals of Neurology*, 81(6), pp. 772–781. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.24951>.

Stark, K. *et al.* (1994) 'Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4', *Nature*, 372(6507), pp. 679–683. Available at: <https://doi.org/10.1038/372679a0>.

Stenvang, J. *et al.* (2012) 'Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides', *Silence*, 3, p. 1. Available at: <https://doi.org/10.1186/1758-907X-3-1>.

Stevens, J.C. *et al.* (2003) 'Developmental Expression of the Major Human Hepatic CYP3A Enzymes', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(2), pp. 573–582. Available at: <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054841>.

Stevens, J.C. *et al.* (2008) 'Developmental Changes in Human Liver CYP2D6 Expression', *Drug Metabolism and Disposition*, 36(8), pp. 1587–1593. Available at: <https://doi.org/10.1124/dmd.108.021873>.

Sun, W. *et al.* (2022) 'ALKBH5 promotes lung fibroblast activation and silica-induced pulmonary fibrosis through miR-320a-3p and FOXM1', *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), p. 26. Available at: <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00329-5>.

Sun, Y. *et al.* (2018) 'miR-24 and miR-122 Negatively Regulate the Transforming Growth Factor- $\beta$ /Smad Signaling Pathway in Skeletal Muscle Fibrosis', *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 11, pp. 528–537. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.04.005>.

Suzuki, T., Nishio, K. and Tanabe, S. (2001) 'The MRP family and anticancer drug metabolism', *Current Drug Metabolism*, 2(4), pp. 367–377. Available at: <https://doi.org/10.2174/1389200013338289>.

Svegliati, S. *et al.* (2014) 'Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression of the Wnt inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis', *Science Signaling*, 7(341), pp. ra84–ra84. Available at: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004592>.

Sweet, D.H. (2005) 'Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), pp. 198–215. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.016>.

Tai, C.-M. *et al.* (2012) 'Improvement of nonalcoholic fatty liver disease after bariatric surgery in morbidly obese Chinese patients', *Obesity Surgery*, 22(7), pp. 1016–1021. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11695-011-0579-7>.

Tajiri, K. and Shimizu, Y. (2013) 'Liver physiology and liver diseases in the elderly', *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(46), pp. 8459–8467. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8459>.

Takahashi, M. *et al.* (2018) 'Safety and effectiveness of istradefylline in patients with Parkinson's disease: interim analysis of a post-marketing surveillance study in Japan', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(15), pp. 1635–1642. Available at: <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1518433>.

Tandon, A. *et al.* (2010) 'Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology', *Current Molecular Medicine*, 10(6), pp. 565–578. Available at: <https://doi.org/10.2174/1566524011009060565>.

Tang, Q. *et al.* (2021) 'Cisplatin-induced ototoxicity: Updates on molecular mechanisms and otoprotective strategies', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 163, pp. 60–71. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.008>.

Tang, W. and Lu, A.Y.H. (2010) 'Metabolic bioactivation and drug-related adverse effects: current status and future directions from a pharmaceutical research perspective', *Drug Metabolism Reviews*, 42(2), pp. 225–249. Available at: <https://doi.org/10.3109/03602530903401658>.

Tao, G. *et al.* (2020) 'Role of drug metabolizing enzymes in chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity and hepatotoxicity', *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 16(11), pp. 1109–1124. Available at: <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1815705>.

Tao, H. *et al.* (2016) 'Wnt signaling pathway in cardiac fibrosis: New insights and directions', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 65(2), pp. 30–40. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.013>.

Testa, B. and Krämer, S.D. (2007) 'The Biochemistry of Drug Metabolism - An Introduction: Part 2. Redox Reactions and Their Enzymes', *Chemistry & Biodiversity*, 4(3), pp. 257–405. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790032>.

Testa, B. and Krämer, S.D. (2009) 'The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 5. Metabolism and bioactivity', *Chemistry & Biodiversity*, 6(5), pp. 591–684. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900022>.

Testa, B., Pedretti, A. and Vistoli, G. (2012) 'Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics', *Drug Discovery Today*, 17(11–12), pp. 549–560. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.01.017>.

Thannickal, V.J. *et al.* (2014) 'Fibrosis: ultimate and proximate causes', *The Journal of Clinical Investigation*, 124(11), pp. 4673–4677. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI74368>.

Theocharis, A. *et al.* (2012) '1.1 Extracellular matrix: a functional scaffold', in *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*. De Gruyter, pp. 3–20. Available at: <https://doi.org/10.1515/9783110258776.3>.

Theocharis, A.D. *et al.* (2010) 'Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting', *The FEBS Journal*, 277(19), pp. 3904–3923. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07800.x>.

Theocharis, A.D. *et al.* (2014) 'Cell–matrix interactions: focus on proteoglycan–proteinase interplay and pharmacological targeting in cancer', *The FEBS Journal*, 281(22), pp. 5023–5042. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.12927>.

Theocharis, A.D. *et al.* (2016) 'Extracellular matrix structure', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, pp. 4–27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.

Théret, N. *et al.* (1999) 'MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 30(2), pp. 462–468. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.510300236>.

Théret, N. (2001) 'Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas', *Hepatology*, 34(1), pp. 82–88. Available at: <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.25758>.

Thiebaut, F. *et al.* (1987) 'Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), pp. 7735–7738. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7735>.

Thrall, M.E.V., R.A. Gies, J.M. Benson (2000) 'Comparative Metabolism of Carbon Tetrachloride in Rats, Mice, and Hamsters Using Gas Uptake and Pbpk Modeling', *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 60(8), pp. 531–548. Available at: <https://doi.org/10.1080/00984100050082085>.

Tomasek, J.J. *et al.* (2002) 'Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(5), pp. 349–363. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm809>.

Torra, R. and Furlano, M. (2019) 'New therapeutic options for Alport syndrome', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 34(8), pp. 1272–1279. Available at: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz131>.

Townsend, D.M. *et al.* (2009) 'Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity', *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 63(2), pp. 79–85. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.08.004>.

Triboulet, R. *et al.* (2007) 'Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication', *Science (New York, N.Y.)*, 315(5818), pp. 1579–1582. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1136319>.

Troeger, J.S. *et al.* (2012) 'Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice', *Gastroenterology*, 143(4), pp. 1073–1083.e22. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.036>.

Tsang, R.Y., Al-Fayea, T. and Au, H.-J. (2009) 'Cisplatin Overdose', *Drug Safety*, 32(12), pp. 1109–1122. Available at: <https://doi.org/10.2165/11316640-000000000-00000>.

Tsochatzis, E.A. *et al.* (2011) 'Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: A meta-analysis of diagnostic accuracy', *Journal of Hepatology*, 54(4), pp. 650–659. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.033>.

Tsujimura, K. *et al.* (2015) 'miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes', *Cell Reports*, 12(11), pp. 1887–1901. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.028>.

Tsukada, S. *et al.* (2005) 'SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), pp. 10055–10064. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M409381200>.

Tzavlaki, K. and Moustakas, A. (2020) 'TGF- $\beta$  Signaling', *Biomolecules*, 10(3), p. 487. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom10030487>.

Uehara, T., Pogribny, I.P. and Rusyn, I. (2014) 'The DEN and CCl<sub>4</sub>-induced Mouse Model of Fibrosis and Inflammation-associated Hepatocellular Carcinoma', *Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]*, 66, p. 14.30.1-14.30.10. Available at: <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1430s66>.

Unsal, V., Cicek, M. and Sabancilar, İ. (2021) 'Toxicity of carbon tetrachloride, free radicals and role of antioxidants', *Reviews on Environmental Health*, 36(2), pp. 279–295. Available at: <https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0048>.

Van der Hauwaert, C. *et al.* (2019) 'Non-Coding RNAs as New Therapeutic Targets in the Context of Renal Fibrosis', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), p. 1977. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20081977>.

van der Ree, M.H. *et al.* (2016) 'Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma', *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(1), pp. 102–113. Available at: <https://doi.org/10.1111/apt.13432>.

van Grunsven, L.A. (2017) '3D in vitro models of liver fibrosis', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, pp. 133–146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.004>.

Vanruijven, M., Degroot, J. and Smoorenburg, G. (2004) 'Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration. A quantitative histological study', *Hearing Research*, 197(1–2), pp. 44–54. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(04\)00241-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(04)00241-2).

VanSlyke, J.K., Boswell, B.A. and Musil, L.S. (2018) 'Fibronectin regulates growth factor signaling and cell differentiation in primary lens cells', *Journal of Cell Science*, 131(22), p. jcs217240. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.217240>.

Varma, S., Orgel, J.P.R.O. and Schieber, J.D. (2016) 'Nanomechanics of Type I Collagen', *Biophysical Journal*, 111(1), pp. 50–56. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.038>.

Vasiliou, V., Vasiliou, K. and Nebert, D.W. (2009) 'Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family', *Human Genomics*, 3(3), pp. 281–290. Available at: <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>.

Verrecchia, F. and R dini, F. (2018) 'Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Plays a Pivotal Role in the Interplay Between Osteosarcoma Cells and Their Microenvironment', *Frontiers in Oncology*, 8, p. 133. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00133>.

Viereck, J. *et al.* (2016) 'Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling', *Science Translational Medicine*, 8(326), p. 326ra22. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf1475>.

Visse, R. and Nagase, H. (2003) 'Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry', *Circulation Research*, 92(8), pp. 827–839. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>.

Wagner, J.M. and Karnitz, L.M. (2009) 'Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components that Differentially Affect Tumor Cell Survival', *Molecular Pharmacology*, 76(1), pp. 208–214. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.109.055178>.

Wahl, S.M. *et al.* (1990) 'Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 593, pp. 188–196. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb16111.x>.

Wai, C.-T. *et al.* (2003) 'A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C', *Hepatology*, 38(2), pp. 518–526. Available at: <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50346>.

Wan, A.M.D. *et al.* (2013) 'Fibronectin conformation regulates the proangiogenic capability of tumor-associated adipogenic stromal cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(9), pp. 4314–4320. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.033>.

Wan, W.B. and Seth, P.P. (2016) 'The Medicinal Chemistry of Therapeutic Oligonucleotides', *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(21), pp. 9645–9667. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00551>.

Wang, B. *et al.* (2012b) 'Suppression of microRNA-29 Expression by TGF- $\beta$ 1 Promotes Collagen Expression and Renal Fibrosis', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 23(2), pp. 252–265. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2011010055>.

Wang, C. *et al.* (2001) 'TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK', *Nature*, 412(6844), pp. 346–351. Available at: <https://doi.org/10.1038/35085597>.

- Wang, D. and Lippard, S.J. (2005) 'Cellular processing of platinum anticancer drugs', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(4), pp. 307–320. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd1691>.
- Wang, H. and Ji, X. (2020) 'SMAD6, positively regulated by the DNMT3A-miR-134-5p axis, confers promoting effects to cell proliferation, migration and EMT process in retinoblastoma', *Cancer Cell International*, 20(1), p. 23. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1103-8>.
- Wang, Q. *et al.* (2005) 'Glucuronidation and sulfation of 7-hydroxycoumarin in liver matrices from human, dog, monkey, rat, and mouse', *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 41(3), pp. 97–103. Available at: <https://doi.org/10.1290/0501005.1>.
- Wang, S. *et al.* (2019) 'Long non-coding RNA DNMT3A promotes tumor progression and EMT in gastric cancer by associating with Snail', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 511(1), pp. 57–62. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.030>.
- Wang, S.-W. *et al.* (2018) 'Astilbin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through reducing oxidative stress and inflammation', *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 114, pp. 227–236. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.041>.
- Wang, W. *et al.* (2021) 'Tumor-associated mesenchymal stem cells promote hepatocellular carcinoma metastasis via a DNMT3A/KDM6B/TIAM1 axis', *Cancer Letters*, 503, pp. 19–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.011>.
- Wang, X. *et al.* (2022) 'Caffeine reduces oxidative stress to protect against hyperoxia-induced lung injury via the adenosine A2A receptor/cAMP/PKA/Src/ERK1/2/p38MAPK pathway', *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 27(1), pp. 270–278. Available at: <https://doi.org/10.1080/13510002.2022.2143114>.
- Wang, Y.-M. *et al.* (2012a) 'Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8(7), pp. 803–817. Available at: <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.685237>.
- Wang, Z. *et al.* (2022) 'miR-21 Negatively Regulates the PTEN-PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Crohn's Disease by Altering Immune Tolerance and Epithelial-Mesenchymal Transition', *Discovery Medicine*, 34(171), pp. 45–58.
- Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953) 'Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid', *Nature*, 171(4356), pp. 737–738. Available at: <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- Weber, L.W.D., Boll, M. and Stampfl, A. (2003) 'Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model', *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2), pp. 105–136. Available at: <https://doi.org/10.1080/713611034>.
- Wei, C.J., Li, W. and Chen, J.-F. (2011) 'Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1808(5), pp. 1358–1379. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.018>.
- Wei, Q. *et al.* (2007) 'Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(4), pp. F1282–F1291. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00230.2007>.

- Weiskirchen, R., Weiskirchen, S. and Tacke, F. (2019) 'Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications', *Molecular Aspects of Medicine*, 65, pp. 2–15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.06.003>.
- Wen, S.-L. *et al.* (2016) 'Collapsed Reticular Network and its Possible Mechanism during the Initiation and/or Progression of Hepatic Fibrosis', *Scientific Reports*, 6(1), p. 35426. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep35426>.
- Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) 'Cytochromes P450: a success story', *Genome Biology*, 1(6), p. REVIEWS3003. Available at: <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003>.
- White, J.M. (2003) 'ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions', *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5), pp. 598–606. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.08.001>.
- Wilder-Smith, C.H., Hufschmid, E. and Thormann, W. (1998) 'The visceral and somatic antinociceptive effects of dihydrocodeine and its metabolite, dihydromorphine. A cross-over study with extensive and quinidine-induced poor metabolizers', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 45(6), pp. 575–581. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00727.x>.
- Wilkinson, H.N. and Hardman, M.J. (2020) 'Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes', *Open Biology*, 10(9), p. 200223. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>.
- Williams, R.T. (1947) 'Detoxication mechanisms. The metabolism of drugs and allied organic compounds.', *Detoxication mechanisms. The metabolism of drugs and allied organic compounds*. [Preprint]. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19482201933> (Accessed: 7 December 2022).
- Winkle, M. *et al.* (2021) 'Noncoding RNA therapeutics — challenges and potential solutions', *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(8), pp. 629–651. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00219-z>.
- Wolbold, R. *et al.* (2003) 'Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 38(4), pp. 978–988. Available at: <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50393>.
- Wu, J. and Zern, M.A. (2000) 'Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis', *Journal of Gastroenterology*, 35(9), pp. 665–672. Available at: <https://doi.org/10.1007/s005350070045>.
- Wu, J.-J. *et al.* (2010) 'Type III Collagen, a Fibril Network Modifier in Articular Cartilage', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(24), pp. 18537–18544. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112904>.
- Wu, Z., Asokan, A. and Samulski, R.J. (2006) 'Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy', *Molecular Therapy*, 14(3), pp. 316–327. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.009>.
- Wynn, T. (2008) 'Cellular and molecular mechanisms of fibrosis', *The Journal of pathology*, 214(2), pp. 199–210. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.2277>.
- Wynn, T.A. (2007) 'Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases', *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), pp. 524–529. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI31487>.

- Wynn, T.A. (2011) 'Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis', *The Journal of Experimental Medicine*, 208(7), pp. 1339–1350. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20110551>.
- Wynn, T.A. and Ramalingam, T.R. (2012) 'Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease', *Nature Medicine*, 18(7), pp. 1028–1040. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.2807>.
- Xiao, J. *et al.* (2007) 'Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4', *Journal of Cellular Physiology*, 212(2), pp. 285–292. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.21062>.
- Xiao, J. *et al.* (2012) 'miR-29 Inhibits Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice', *Molecular Therapy*, 20(6), pp. 1251–1260. Available at: <https://doi.org/10.1038/mt.2012.36>.
- Xiao, L. and Dudley, A.C. (2017) 'Fine-tuning vascular fate during endothelial-mesenchymal transition', *The Journal of Pathology*, 241(1), pp. 25–35. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.4814>.
- Xu, P. *et al.* (2019) 'Deficiency of apoptosis-stimulating protein 2 of p53 protects mice from acute hepatic injury induced by CCl4 via autophagy', *Toxicology Letters*, 316, pp. 85–93. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.09.006>.
- Xu, S. *et al.* (2022) 'Nuclear farnesoid X receptor attenuates acute kidney injury through fatty acid oxidation', *Kidney International*, 101(5), pp. 987–1002. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.01.029>.
- Xu, Y., Wang, C. and Li, Z. (2014) 'A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress', *Molecular and Clinical Oncology*, 2(1), pp. 3–7. Available at: <https://doi.org/10.3892/mco.2013.202>.
- Xu-Dubois, Y.-C. *et al.* (2013) 'Epithelial phenotypic changes are associated with a tubular active fibrogenic process in human renal grafts', *Human Pathology*, 44(7), pp. 1251–1261. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.10.010>.
- Yan, X. *et al.* (2016) 'Smad7 Protein Interacts with Receptor-regulated Smads (R-Smads) to Inhibit Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad Signaling', *The Journal of Biological Chemistry*, 291(1), pp. 382–392. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694281>.
- Yancey, A. *et al.* (2012) 'Risk factors for cisplatin-associated ototoxicity in pediatric oncology patients', *Pediatric Blood & Cancer*, 59(1), pp. 144–148. Available at: <https://doi.org/10.1002/pbc.24138>.
- Yang, X. *et al.* (2020) 'Twist1-induced miR-199a-3p promotes liver fibrosis by suppressing caveolin-2 and activating TGF- $\beta$  pathway', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), p. 75. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0169-z>.
- Yanguas, S.C. *et al.* (2016) 'Experimental models of liver fibrosis', *Archives of Toxicology*, 90(5), pp. 1025–1048. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1543-4>.
- Yao, X. *et al.* (2007) 'Cisplatin nephrotoxicity: a review', *The American Journal of the Medical Sciences*, 334(2), pp. 115–124. Available at: <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e>.
- Yehualaeshet, T. *et al.* (1999) 'Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36', *The American Journal of Pathology*, 155(3), pp. 841–851. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65183-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65183-8).

- Yi, J.Y., Shin, I. and Arteaga, C.L. (2005) 'Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), pp. 10870–10876. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M413223200>.
- Yoshizawa, M. *et al.* (2022) 'Computational simulation of liver fibrosis dynamics', *Scientific Reports*, 12(1), p. 14112. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18123-w>.
- Young, A. *et al.* (2016) 'Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses', *Cancer Cell*, 30(3), pp. 391–403. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.025>.
- Young, J.D. *et al.* (2013) 'The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29', *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2), pp. 529–547. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.007>.
- Yu, B. *et al.* (2017) 'MicroRNA-33a deficiency inhibits proliferation and fibrosis through inactivation of TGF- $\beta$ /Smad pathway in human cardiac fibroblasts', *Die Pharmazie*, 72(8), pp. 456–460. Available at: <https://doi.org/10.1691/ph.2017.7561>.
- Yu, B. *et al.* (2020) 'Targeting Rho-associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) in cardiovascular fibrosis and stiffening', *Expert opinion on therapeutic targets*, 24(1), pp. 47–62. Available at: <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1712593>.
- Yu, K. *et al.* (2018) 'Involvement of epithelial–mesenchymal transition in liver fibrosis', *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 24(1), pp. 5–11. Available at: [https://doi.org/10.4103/sjg.SJG\\_297\\_17](https://doi.org/10.4103/sjg.SJG_297_17).
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000) 'Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis', *Genes & Development*, 14(2), pp. 163–176. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.163>.
- Yuan, J. *et al.* (2017) 'Mir-21 Promotes Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction Via Targeting Smad7', *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 42(6), pp. 2207–2219. Available at: <https://doi.org/10.1159/000479995>.
- Yun, K.U. *et al.* (2010) 'Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats', *Archives of Toxicology*, 84(12), pp. 939–946. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0520-1>.
- Zanger, U.M. and Schwab, M. (2013) 'Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation', *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), pp. 103–141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.
- Zeisberg, E.M. *et al.* (2008) 'Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 19(12), pp. 2282–2287. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050513>.
- Zeisberg, M. and Duffield, J.S. (2010) 'Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(8), pp. 1247–1253. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2010060616>.

- Zhang, G. *et al.* (2005) 'Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis', *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 5(1), pp. 5–21.
- Zhang, H. *et al.* (2021) 'Hypoxia regulates overall mRNA homeostasis by inducing Met1-linked linear ubiquitination of AGO2 in cancer cells', *Nature Communications*, 12(1), p. 5416. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25739-5>.
- Zhang, J. *et al.* (2015) 'LncRNA MALAT1 overexpression is an unfavorable prognostic factor in human cancer: evidence from a meta-analysis', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(4), pp. 5499–5505.
- Zhang, J. *et al.* (2021) 'Cisplatin chemotherapy and renal function', *Advances in cancer research*, 152, pp. 305–327. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.03.008>.
- Zhang, L. and Yang, F. (2022) 'Tanshinone IIA improves diabetes-induced renal fibrosis by regulating the miR-34-5p/Notch1 axis', *Food Science & Nutrition*, 10(11), pp. 4019–4040. Available at: <https://doi.org/10.1002/fsn3.2998>.
- Zhang, Y.E. (2017) 'Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(2), p. a022129. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022129>.
- Zhao, B. *et al.* (2022) 'Exosomal miRNA-181a-5p from the cells of the hair follicle dermal papilla promotes the hair follicle growth and development via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway', *International Journal of Biological Macromolecules*, 207, pp. 110–120. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.177>.
- Zhao, M. *et al.* (2021a) 'Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), p. 12808. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>.
- Zhao, S. *et al.* (2021b) 'Exosomal miR-21 from tubular cells contributes to renal fibrosis by activating fibroblasts via targeting PTEN in obstructed kidneys', *Theranostics*, 11(18), p. 8660. Available at: <https://doi.org/10.7150/thno.62820>.
- Zhao, X. *et al.* (2020) 'Targeting metabolic dysregulation for fibrosis therapy', *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(1), pp. 57–75. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0040-5>.
- Zhou, S.-F. (2008) 'Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4', *Current Drug Metabolism*, 9(4), pp. 310–322. Available at: <https://doi.org/10.2174/138920008784220664>.
- Zhou, X. *et al.* (2004) 'Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis', *Liver International*, 24(5), pp. 492–501. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2004.0946.x>.
- Zhou, Y., Schneider, D.J. and Blackburn, M.R. (2009) 'Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease', *Pharmacology & therapeutics*, 123(1), pp. 105–116. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.04.003>.
- Zhu, F.-Y. *et al.* (2018) 'Comparative performance of the BGISEQ-500 and Illumina HiSeq4000 sequencing platforms for transcriptome analysis in plants', *Plant Methods*, 14(1), p. 69. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0337-0>.

Zimmerman, M.A. *et al.* (2013) 'Biological implications of extracellular adenosine in hepatic ischemia and reperfusion injury', *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 13(10), pp. 2524–2529. Available at: <https://doi.org/10.1111/ajt.12398>.

Zunino, F. *et al.* (1989) 'Protective effect of reduced glutathione against cisplatin-induced renal and systemic toxicity and its influence on the therapeutic activity of the antitumor drug', *Chemico-Biological Interactions*, 70(1–2), pp. 89–101. Available at: [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(89\)90065-3](https://doi.org/10.1016/0009-2797(89)90065-3).

## Sites internet

<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/7000> - consulté le 21/12/2022

<https://www.pharmvar.org/> - consulté le 30/01/2023

<https://www.bioparadigms.org/> - consulté le 30/01/2023

<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241565196> - consulté le 02/02/2023

<https://www.rfcrpv.fr/etude-iatrostat/> - consulté le 03/02/2023

<https://www.biomodels.com/disease-areas/fibrosis/liver-fibrosis> - consulté le 03/02/2023

<https://www.addgene.org/guides/aav/> - consulté le 05/02/2022

## Annexes

---

## Annexe 1 :

Larrue R\*, **Fellah S\***, Van der Hauwaert C, Hennino MF, Perrais M, Lionet A, Glowacki F, Pottier N, Cauffiez C.

**The versatile role of miR-21 in renal homeostasis and diseases.**

Cells. 2022 ; 11 : 3525.

\* contribution équivalente

## Annexe 2 :

**Fellah S\***, Larrue R\*, Truchi M, Vassaux G, Mari B, Cauffiez C, Pottier N.

**Pervasive roles of the long non coding RNA DNMT3OS in development and diseases.** *WIRE's RNA*. 2022 ; e17.

\* Contribution équivalente

## Annexe 3 :

Arrighi N, Moratal C, Savary G, Fassy J, Nottet N, Pons N, Clément N, **Fellah S**, Larrue R, Magnone V, Lebrigand K, Pottier N, Dechesne C, Vassaux G, Dani C, Peraldi P, Mari B.

**The Fibromir miR-214-3p is upregulated in Duchenne Muscular Dystrophy and promotes differentiation of human fibro-adipogenic muscle progenitors.** *Cells*. 2021 ; 10 : 1832.

## Annexe 4 :

Dewaeles E\*, Carvalho K\*, **Fellah S\***, Sim J, Boukrout N, Caillierez C, Ramakrishnan H, Van der Hauwaert C, Vijayashankara J, Martin N, Massri N, Launay A, Folger JK, De Schutter C, Larrue R, Loison I, Goujon M, Jung M, Le Gras S, Gomez-Murcia V, Faivre E, Lemaire J, Garat A, Beauval N, Maboudou P, Gnemmi V, Gibier JB, Buée L, Abbadie C, Glowacki F, Pottier N, Perrais M, Cunha RA, Annicotte JS, Laumet G, Blum D, Cauffiez C.

**Istradefylline (KW6002) protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin anti-tumor effects.** J Clin Invest. 2022 ; 132(22) : e152924.

\* Contribution équivalente