



Thèse de Doctorat d'Université

Université de Lille

École Doctorale Biologie Santé de Lille

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Ciblage de MUC1 : impact sur les propriétés et les phénomènes de chimiorésistance au cisplatine dans les cellules cancéreuses pulmonaires.

Marine GOUJON

Sous la direction du Pr. Michaël PERRAIS

Soutenue publiquement
le 3 décembre 2024.

Membres du jury :

Monsieur le Docteur David TULASNE
Madame le Docteur Céline GONGORA
Monsieur le Docteur Laurent DELPY
Monsieur le Professeur Michaël PERRAIS

Président du jury
Rapporteure
Rapporteur
Directeur de thèse

« Tout est possible à qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais »
– Xavier Dolan

« Les poumons sont les ailes de notre corps, nous permettant de prendre notre envol » - Anonyme

Ces travaux de recherches ont été réalisés au sein de l'Institut ONCOLille, UMR 9020 CNRS-1277 Inserm Canther « Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies », dirigés par le Dr. Isabelle Van Seuningen, et plus précisément dans les équipes « Mucines, Cancer et Résistance aux drogues » du Dr. Isabelle Van Seuningen et « Senescence, Fibrose et Cancer » du Pr. Corinne Abbadie.

Cette thèse a été réalisée suite à l'obtention d'un contrat doctoral, financé par l'Université de Lille.

Remerciements :

Premièrement, je remercie les membres du jury : le Docteur Céline Gongora et le Docteur Laurent Delpy d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux, ainsi que le Docteur David Tulasne, d'avoir suivi mon parcours depuis mon stage de master 1, jusqu'aujourd'hui, en acceptant d'être examinateur de mes travaux.

Je remercie, tout particulièrement, le Professeur Michaël Perrais de m'avoir proposé de poursuivre mes travaux de master 2 au cours de ce projet de thèse. Je tiens à vous remercier pour votre confiance et votre encadrement au cours de ces, presque, quatre années. Je vous remercie mille fois pour tous vos conseils, votre disponibilité, votre patience, votre gentillesse, toutes vos petites attentions que ce soit à Noël, à Pâques ou à chacun de vos retours de voyages, et surtout, votre bonne humeur légendaire. Ne changez rien dans votre manière d'encadrer vos étudiants, vous êtes le directeur de thèse que tous les étudiants rêvent d'avoir, sachez-le. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous...

Je remercie le Docteur Isabelle Van Seuning, ainsi que le Professeur Corinne Abbadie de m'avoir accueilli au sein de leurs équipes respectives au cours de mes travaux de thèse.

Je remercie, également, tous les membres de l'équipe « Senfib » pour leur accueil chaleureux. Merci Nathalie, grâce à toi, je suis la reine des essais comètes. Merci Ingrid d'avoir été une oreille attentive ainsi que pour tous tes encouragements et attentions au cours de ces deux dernières années. Merci à Clémentine, Nihad, Quentin, Adrien et tous les autres, pour la bonne ambiance que vous mettez au sein de l'équipe. Un grand merci, à toi Emma pour ton aide dans les manips et ta gentillesse. Bon courage pour tes deux dernières années de thèse, je ne me fais aucun souci pour toi.

Un grand merci à mes amies et co-thésardes, Elodie et Julie, d'avoir toujours été là et cela depuis le master. Merci pour votre aide, nos « soirées dépression » et nos pauses ragots : sans vous, cette thèse aurait été bien différente. Ne lâchez rien les filles, la fin est plus proche que jamais !

Enfin, un énorme merci à mes meilleurs amis, Marie et Kevin, pour leur soutien indéfectible.

Un inconditionnel merci à mes parents, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci d'avoir cru en moi pendant toutes ces années. Merci pour votre soutien sans faille et votre confiance. Aujourd'hui, c'est grâce à vous si j'en suis arrivée jusqu'ici et j'espère que vous êtes fiers de moi...

Merci, Guillaume, pour ta patience et ta confiance. Le meilleur reste à venir pour nous.

...Et merci à mon chat, Plume, pour tous ses « ronrons » et câlins si réconfortants.

Résumé :

Malgré les avancées dans le diagnostic et la prise en charge des cancers au cours des dernières années, le carcinome pulmonaire reste la première cause de mortalité par cancer dans le monde, tuant chaque année 1,8 millions de malades. Son agressivité est telle que son taux de survie à 5 ans n'excède pas les 20%. Représenté à 85% par le sous-type non à petites cellules, le cancer du poumon est le plus souvent diagnostiqué à des stades localement avancés, rendant la résection chirurgicale impossible. En dépit de l'essor de nouvelles thérapies puissantes telles que les immunothérapies qui ciblent les « immunes checkpoints » et les thérapies ciblées, le recours à des traitements à visées systémiques, comme les chimiothérapies cytotoxiques à base de sels de platine (cisplatine) demeure un des traitements de référence dans la prise en charge des cancers bronchiques. Bien que les puissants effets antinéoplasiques du cisplatine soient reconnus depuis des décennies, de nombreux patients sont en échec thérapeutique, notamment à cause de résistances primaires ou secondaires.

MUC1 est une large *O*-glycoprotéine transmembranaire surexprimée dans 2/3 des cancers, dont le cancer du poumon, et est connue comme jouant un rôle dans la progression tumorale et comme étant associée à des signatures de la chimiorésistance.

L'objectif de ce projet a été de mieux comprendre le rôle de MUC1 (i) sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires et (ii) dans la chimiorésistance au cisplatine, (iii) et de tester une stratégie oligonucléotide antisens afin de définir MUC1 comme nouvelle cible thérapeutique.

Dans cette étude, cinq lignées d'adénocarcinomes pulmonaires ont été utilisées : quatre lignées d'adénocarcinomes pulmonaires invalidées pour l'expression de MUC1 par une stratégie CRISPR/Cas9 ou ciblées par un oligonucléotide antisens de type GapmeR (H1975, A549, HCC827 et H282), ainsi qu'une lignée d'adénocarcinome pulmonaire surexprimant de manière stable MUC1 (PC9). Des tests MTS, de prolifération, de migration et d'invasion, des western blot, des essais comètes, des immunofluorescences, de la cytométrie en flux et des qPCR ont été utilisés.

Nos résultats montrent que l'expression de MUC1 (i) est associée à une augmentation de la survie, de la prolifération cellulaire, des capacités migratoires et invasives, mais aussi de la capacité à former des colonies, (ii) entraîne une chimiorésistance au cisplatine, (iii) module l'expression des pompes d'influx et d'efflux du cisplatine, (iv) protège des dommages à l'ADN, d'un arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, et (v) augmente l'expression des marqueurs de cellules souches. L'utilisation d'un GapmeR ciblant MUC1 permet de diminuer ces différentes propriétés.

En conclusion, nos résultats montrent que MUC1 est une actrice de la progression tumorale et de la chimiorésistance au cisplatine. Nos résultats suggèrent donc que MUC1 représente une cible thérapeutique intéressante afin de limiter la progression des cancers bronchiques non à petites cellules et d'améliorer la sensibilité aux traitements.

Abstract :

Despite advances in cancer diagnosis and treatment, lung cancer remains the leading cause of cancer death worldwide, killing 1.8 million patients each year. Its aggressiveness is such that its 5-year survival rate doesn't exceed 20%. Represented at 85% by the non-small cell subtype (NSCLC), lung cancer is often diagnosed at locally advanced stages making surgical resection impossible. Despite the rise of powerful therapies such as immunotherapies targeting immune checkpoints and targeted therapies, the use of systemic treatments such as platinum-based cytotoxic chemotherapy (cisplatin) remains one of the standard treatments in the management of bronchial cancers. Although the powerful antineoplastic effects of cisplatin have been recognized for decades, many patients fail to benefit from the drug, notably due to primary or secondary resistance.

MUC1 is a large transmembrane *O*-glycoprotein overexpressed in 2/3 of all cancer cases, including lung cancer, and is known to be a key player in tumoral progression and to be associated with chemoresistance signatures.

In this context, the project aims to better understand MUC1 roles (i) on lung cancer cell properties and (ii) chemoresistance to cisplatin, and (iii) to test an antisense oligonucleotide strategy to define MUC1 as a new therapeutic target.

In our project, five adenocarcinoma cell lines are used: H1975, A549, HCC827 and H292 invalidated for MUC1 expression by Crispr/Cas9 technology or knock-down by antisense oligonucleotides (ASO) as well as PC9 stably overexpressing MUC1 (PC9). MTS, proliferation assays, migration/ invasion assays, immunofluorescence, western blot, comet assays and qPCR are used.

Our results show that MUC1 expression (i) is associated with increased cell survival, proliferation, migratory and invasive capacities, as well as the abilities to form colonies, (ii) leads to cisplatin chemoresistance, (iii) modulates expression of cisplatin influx and efflux pumps including ABC family efflux pumps, and (iv) protects cells treated with cisplatin against DNA damages, proliferation stop and apoptosis and (v) increases stem cell markers expressions. Moreover, targeting MUC1 with an ASO decreases all these properties.

In conclusion, in NSCLC, our results show that MUC1 is an actor of tumor progression, by promoting cell survival, proliferation, migration and invasion and is also involved in cisplatin chemoresistance. Overall, our data suggest that MUC1 may represent a novel therapeutic approach to limit NSCLC progression and improve drug sensitivity, since using an ASO strategy can reverse these properties.

Table des matières :

Remerciements	5
Résumé	6
Abstract	7
Table des matières	10
Liste des figures	16
Liste des figures supplémentaires	18
Liste des tableaux	19
Liste des annexes	19
Liste des abréviations	20
Publications et communications orales/affichées	23
 I. Le cancer du poumon	 26
1) Le poumon	26
2) Épidémiologie	26
3) Les facteurs de risques	27
4) Les sous types histologiques	28
a) <i>Le carcinome bronchique à petites cellules</i>	28
b) <i>Le carcinome bronchique non à petites cellules</i>	28
i) <i>Les adénocarcinomes</i>	29
ii) <i>Les carcinomes épidermoïdes ou squameux</i>	29
iii) <i>Les carcinomes à grandes cellules</i>	30
5) Le diagnostic	30
6) Les différents stades	31
 II. Les lignes de traitements	 33
1) La chirurgie	33
2) La radiothérapie	34
3) Les thérapies ciblées	34
4) Les immunothérapies	37
5) Les chimiothérapies	39
a) <i>Les antimétabolites</i>	40
b) <i>Les inhibiteurs de topoisomérases</i>	41
c) <i>Les agents antimicrotubulaires</i>	41
i) <i>Les taxanes</i>	41
ii) <i>Les alcaloïdes</i>	42
d) <i>Les agents alkylants</i>	42
 III. Le cisplatine	 45
1) Généralités	45
2) Structure	45
3) Prise en charge par la cellule	46
4) Mode d'action du cisplatine	47
a) <i>La voie génotoxique</i>	47
b) <i>Les voies extranucléaires</i>	49
i) <i>La voie mitochondriale</i>	49
ii) <i>La voie du réticulum endoplasmique</i>	50
iii) <i>Les autres voies extranucléaires du cisplatine</i>	50
c) <i>Mort cellulaire induite par le cisplatine</i>	51
i) <i>La voie des récepteurs de mort</i>	52
ii) <i>La voie mitochondriale</i>	52
5) Les mécanismes associés à la résistance au cisplatine	53

a) Facteurs « pré-target » ou en amont de la cible	54
i) Diminution de l'accumulation intracellulaire du cisplatine	54
ii) Diminution de la forme active du cisplatine	55
b) Facteurs « on-target » ou résistance aux dommages à l'ADN	56
i) Activation de protéines impliquées dans la réparation des cassures simples brins	56
ii) Mécanismes de tolérance des dommages à l'ADN simple brin	58
iii) Activation de protéines impliquées dans la réparation des cassures doubles brins	59
c) Facteurs « post-target » ou altérations des voies de signalisation	60
d) Facteurs « off-target »	61
i) La surexpression de proto-oncogène	61
ii) La détoxification cellulaire	61
iii) Acquisition du phénotype « cellule souche cancéreuse »	62
iv) L'autophagie	62
v) Le microenvironnement immunitaire tumoral	63
6) La toxicité du cisplatine	64
a) La néphrotoxicité	65
b) L'ototoxicité	65
c) L'hépatotoxicité	65
d) La neurotoxicité	66
 IV. Généralités sur les mucines	67
1) Les mucines sécrétées	68
a) Les mucines gélifiantes	68
b) Les mucines non gélifiantes	69
2) Les mucines membranaires	70
 V. Mucine 1 (MUC1)	72
1) Expression de MUC1	72
2) Structure du gène MUC1 et sa régulation	72
a) Structure du gène de MUC1	72
b) Régulation d'expression de MUC1	73
i) Régulation transcriptionnelle	73
ii) Régulation post-transcriptionnelle	74
3) Structure et synthèse de MUC1	74
a) MUC1-N	75
b) MUC1-C	76
4) Fonctions physiologiques de MUC1	77
5) MUC1 et pathologies non cancéreuses	79
 VI. MUC1 et cancer	80
1) MUC1 associée au cancer	80
2) MUC1 et progression tumorale	80
a) Interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire	80
b) Prolifération et survie	82
c) Apoptose	84
i) MUC1 et voie mitochondriale ou intrinsèque	84
i) MUC1 et voie des récepteurs de mort ou extrinsèque	85
ii) MUC1 et résistance à l'anoïkis	86
3) MUC1, TEM et métastases	87
4) MUC1 et inflammation	89
5) MUC1 et métabolisme	90
6) MUC1 et angiogenèse	91

7) MUC1 et « checkpoints immunitaires »	92
8) MUC1 et chimiorésistance	94
a) Diminution de l'accumulation intracellulaire des drogues	94
b) Reprogrammation du métabolisme	96
c) Évitement de l'apoptose induite ou non par les dommages à l'ADN	96
VII. Les stratégies thérapeutiques ciblant MUC1	98
1) MUC1 comme biomarqueur	98
2) Les stratégies anticorps	98
a) Les anticorps ciblant MUC1-N	98
b) Les anticorps ciblant MUC1-C	99
c) Les complexes drogue/anticorps	99
d) Les BiTEs	100
3) Les vaccins	100
a) Les vaccins à sous unités	101
b) Les vaccins à ARN	101
c) Les vaccins à ADN	101
d) Les vaccins à glycopeptides	102
4) Les CAR-X cells	102
a) Les CAR-T cells	102
b) Les CAR-NK cells	103
5) Les peptides inhibiteurs	103
6) Les aptamères	104
VIII. MUC1 et cancer du poumon	106
IX. Objectif du projet et travaux personnels	107
X. Résultats	110
Partie 1 : Rôle MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires	110
1) Validation des modèles cellulaires	110
2) Rôle de MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires	111
a) MUC1 et prolifération cellulaire	111
b) MUC1 et viabilité cellulaire	114
c) Migration et invasion	115
i) La migration	116
ii) L'invasion	118
d) Étude la formation de clones à partir d'une cellule unique	119
e) MUC1 et apoptose	120
Partie 2 : Rôle de MUC1 dans la chimiorésistance au cisplatine	122
1) Expression de MUC1 et traitement au cisplatine	122
2) MUC1 et mécanismes de la chimiorésistance	123
a) MUC1 et dommages à l'ADN	125
b) MUC1, cisplatine et prolifération cellulaire	128
c) MUC1, cisplatine et apoptose	130
d) MUC1 et autres mécanismes de la résistance	132
i) Les transporteurs à influx spécifiques au cisplatine	132
ii) Les transporteurs à efflux spécifiques au cisplatine	133
iii) Les transporteurs à efflux à large spectre	134
iv) Acquisition du phénotype « cellule souche cancéreuse »	137

Partie 3 : Ciblage de MUC1 par une stratégie oligonucléotide antisens de type GapmeR	139
1) Généralités sur les GapmeR	139
2) Validation de la stratégie ASO de type GapmeR pour cibler MUC1	140
3) Ciblage de MUC1 par un ASO et impact sur les propriétés cellulaires	142
a) Impact sur la prolifération cellulaire	142
b) Impact sur la viabilité cellulaire	145
c) Impact sur la migration et l'invasion	146
i) La migration	146
ii) L'invasion	147
d) Impact sur la formation de colonies	148
e) Impact sur l'apoptose	149
4) Ciblage de MUC1 et impact sur la chimiorésistance au cisplatine	150
a) Impact sur les dommages à l'ADN	151
b) Impact sur le cycle cellulaire	154
c) Impact sur le processus apoptotique	155
d) Impact sur les autres mécanismes associés à la chimiorésistance	156
i) Les transporteurs à influx et efflux du cisplatine	156
ii) Les transporteurs d'efflux à large spectre	157
iii) Impact sur l'acquisition du phénotype « cellule souche cancéreuse »	158
 XI. Discussion	160
1) Étude du rôle de MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires	161
2) Étude du rôle de MUC1 sur les phénomènes de résistance au cisplatine	162
3) Ciblage de MUC1 avec une stratégie oligonucléotide antisens de type GapmeR	166
 XII. Perspectives	170
1) Explorations complémentaires, <i>in vitro</i> , du rôle de MUC1 dans la résistance au cisplatine	170
2) Confirmation des résultats sur un modèle murin de xénogreffe hétérotopique	171
a) Confirmation du rôle de MUC1 dans la progression tumorale, <i>in vivo</i>	171
b) Confirmation du rôle de MUC1 dans la chimiorésistance au cisplatine, <i>in vivo</i>	172
c) MUC1 cible thérapeutique : effet sur la progression tumorale	172
d) MUC1 cible thérapeutique : effet sur la chimiorésistance au cisplatine	173
3) MUC1 : actrice de la modulation du microenvironnement immunitaire tumoral ?	173
 XIII. Conclusion générale	176
 Figures supplémentaires	178
Annexes	192
Appendice technique	195
Article en 1 ^{er} auteur	208
Références bibliographiques	226
Webographie	249

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ABRÉVIATIONS

Liste des figures :

Figure 1 : Anatomie des poumons.

Figure 2 : Coupes histologiques d'adénocarcinomes pulmonaires.

Figure 3 : Coupes histologiques de carcinomes épidermoïdes ou squameux.

Figure 4 : Répartition des « drivers oncogéniques » identifiés dans les différents sous-types de CBNPCs.

Figure 5 : Le ciblage des « Immune Checkpoint » PD-L1 et CTLA4 favorise l'activation cytotoxique des lymphocytes T ainsi que la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses.

Figure 6 : Structures chimiques des principaux dérivés du platine.

Figure 7 : Processus « d'aquation » ou d'hydrolyse du cisplatine.

Figure 8 : Les différents types d'adduits générés par le cisplatine et leur proportion.

Figure 9 : Mode d'action principale du cisplatine : la voie génotoxique.

Figure 10 : Les voies de signalisation de l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

Figure 11 : Schéma récapitulatif des modes d'actions du cisplatine.

Figure 12 : Mécanismes impliqués dans la résistance « Pre-target » au cisplatine.

Figure 13 : Mécanisme de réparation de l'ADN par la voie NER.

Figure 14 : Mécanisme de réparation de l'ADN *via* la voie MMR.

Figure 15 : Mécanismes de réparation des dommages à l'ADN double brins.

Figure 16 : Le devenir de la cellule dépend du niveau d'activation de p53.

Figure 17 : Dégradation d'organites ou protéines endommagées *via* la voie autophagique.

Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des mécanismes impliqués dans la résistance au cisplatine.

Figure 19 : Classification et structure des différentes mucines membranaires et sécrétées.

Figure 20 : Représentation schématique des différents types de mucines et de leur structure.

Figure 21 : Représentation schématique de la structure du gène de MUC1.

Figure 22 : Représentation schématique de l'hétérodimère MUC1.

Figure 23 : Représentation schématique de la structure de MUC1.

Figure 24 : Séquence en acides aminés de la queue cytoplasmique de MUC1 (MUC1-CT) et mise en évidence des sites de phosphorylations potentielles et d'interactions avec diverses protéines.

Figure 25 : Représentation schématique de la contribution de MUC1 à la formation de barrière physique formée par le mucus, suite à son clivage par des sheddases de la famille des métalloprotéases.

Figure 26 : Représentation schématique de l'activation de MUC1-C après homodimérisation, clivage et sa translocation nucléaire.

Figure 27 : MUC1 contribue à la perte de polarité cellulaire en perturbant les jonctions serrées et adhérentes, suite à un stress.

Figure 28 : MUC1 stabilise la β -caténine et permet l'activation de ses gènes cibles dont celui de la cycline D1, favorisant la prolifération cellulaire.

Figure 29 : Représentation schématique du rôle de MUC1 dans la résistance à l'apoptose.

Figure 30 : Schéma récapitulatif des voies impliquées dans la TEM médiée par MUC1.

Figure 31 : Représentation schématique du rôle de MUC1 dans l'évasion immunitaire.

Figure 32 : Représentation schématique de l'ensemble des mécanismes médiés par MUC1 empêchant l'accumulation intracellulaire des thérapies anticancéreuses et induisant la résistance.

Figure 33 : MUC1 interfère avec tous les « Hallmarks of cancer ».

Figure 34 : Ensemble des stratégies thérapeutiques ciblant MUC1.

Figure 35 : Données préliminaires.

Figure 36 : Validation des modèles cellulaires après vérification de l'expression de MUC1.

Figure 37 : L'expression de MUC1 favorise la prolifération cellulaire, au sein des différentes lignées d'adénocarcinomes pulmonaires.

Figure 38 : L'expression de MUC1 dans les lignées PC9 et H1975 favorise le marquage au Ki-67.

Figure 39 : L'expression de MUC1 induit la prolifération cellulaire, en favorisant la phosphorylation de Erk 1/2 et la diminution d'expression de p21.

Figure 40 : L'expression de MUC1 favorise la viabilité cellulaire.

Figure 41 : Mesure des capacités de migratoires des modèles cellulaires : MUC1 favorise la migration cellulaire.

Figure 42 : L'expression de MUC1 au sein des différents modèles cellulaires favorise les capacités invasives.

Figure 43 : L'expression de MUC1 favorise la clonogénicité des cellules H1975 et A549.

Figure 44 : MUC1 protège de l'induction de la mort cellulaire par apoptose dans les lignées PC9 et H1975.

Figure 45 : Un traitement au cisplatine augmente l'expression de MUC1 au cours du temps.

Figure 46 : Les cellules exprimant MUC1 sont plus chimiorésistantes au cisplatine.

Figure 47 : L'expression de MUC1 favorise la clonogénicité malgré un traitement cisplatine avec des doses croissantes.

Figure 48 : L'expression de MUC1 protège des dommages à l'ADN.

Figure 49 : L'expression de MUC1 protège d'un arrêt du cycle cellulaire et favorise la prolifération, malgré un traitement au cisplatine.

Figure 50 : L'expression de MUC1 protège de l'entrée en apoptose, en diminuant le clivage de PARP1, de caspase 3 et l'expression de Bax.

Figure 51 : MUC1 module l'expression relative de certains transporteurs à influx spécifiques du cisplatine.

Figure 52 : MUC1 module l'expression relative des transports à efflux spécifique au cisplatine.

Figure 53 : MUC1 module l'expression relative des transporteurs de la famille ABC.

Figure 54 : Évaluation de l'activité des transporteurs à efflux de la famille ABC, par cytométrie en flux, au sein des lignées PC9 et A549, exprimant ou non MUC1.

Figure 55 : MUC1 régule à la hausse l'expression relative de SOX2 et Nanog dans les cellules PC9 et H1975.

Figure 56 : Structure et mécanismes d'action du GapmeR.

Figure 57 : Choix du GapmeR offrant la meilleure inhibition de MUC1.

Figure 58 : Le GapmeR G4 cible MUC1 et induit une diminution de son expression au sein de nos différents modèles cellulaires de CBNPC.

Figure 59 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue la prolifération cellulaire.

Figure 60 : Le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 diminue le marquage Ki-67.

Figure 61 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR favorise un arrêt du cycle cellulaire et diminue la prolifération.

Figure 62 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue la viabilité cellulaire.

Figure 63 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue les propriétés migratoires.

Figure 64 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue les capacités invasives.

Figure 65 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue le nombre de colonies formées dans les cellules H1975 et A549.

Figure 66 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR sensibilise les cellules H1975 à l'apoptose.

Figure 67 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR sensibilise les cellules H1975 et A549 au cisplatine.

Figure 68 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR augmente le nombre de dommages à l'ADN induit par le cisplatine.

Figure 69 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR favorise l'arrêt du cycle cellulaire et diminue le caractère prolifératif.

Figure 70 : Le ciblage de MUC1 favorise la mise en place du processus apoptotique après un traitement au cisplatine.

Figure 71 : Le ciblage de MUC1 augmente l'expression relative de pompes à influx et diminue l'expression des pompes à efflux spécifiques au cisplatine.

Figure 72 : Le ciblage de MUC1 régule, globalement, à la baisse l'expression des transporteurs à efflux de la famille ABC.

Figure 73 : Le ciblage de MUC1 diminue l'expression relative de marqueurs associés au phénotype cellule souche cancéreuse.

Figure 74 : MUC1 régule positivement l'expression de PD-L1, *in vitro* et *in vivo*, et de cytokines associées à l'immunosuppression, *in vitro*.

Liste des figures supplémentaires :

Figure S1 : Validation des modèles cellulaires, par immunofluorescence de MUC1 (x40).

Figure S2 : L'expression de MUC1 favorise la prolifération cellulaire, au sein des différentes lignées d'adénocarcinomes pulmonaires HCC827 et H292.

Figure S3 : L'expression de MUC1 favorise la viabilité cellulaire des cellules HCC827 et H292.

Figure S4 : L'expression de MUC1 favorise la migration des cellules HCC827 et H292.

Figure S5 : L'expression de MUC1 au sein des différents modèles cellulaires favorise les capacités invasives.

Figure S6 : L'expression de MUC1 favorise la clonogénicité des cellules HCC827 et H292.

Figure S7 : Les cellules HCC827 et H292 exprimant MUC1 sont plus chimiorésistantes au cisplatine.

Figure S8 : L'expression de MUC1 diminue le nombre de foci p-ATM par cellule et protège des dommages à l'ADN.

Figure S9 : MUC1 module l'expression de certains transporteurs à influx spécifique du cisplatine, dans les cellules HCC827 et H292.

Figure S10 : MUC1 module l'expression relative des transports à efflux spécifique au cisplatine, dans les cellules HCC827 et H292.

Figure S11 : MUC1 module l'expression des transporteurs à efflux de la famille ABC, dans les cellules HCC827 et H292.

Figure S12 : MUC1 régule à la hausse l'expression relative de SOX2 et Nanog dans les cellules H292.

Figure S13 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue la prolifération cellulaire dans les lignées HCC827 et H292.

Figure S14 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue la viabilité cellulaire des cellules H292 et HCC827.

Figure S15 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue les propriétés migratoires, des cellules HCC827 et H292.

Figure S16 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue les capacités invasives, des cellules HCC827 et H292.

Figure S17 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue le nombre de colonies formées dans les cellules HCC827 et H292.

Figure S18 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR augmente le nombre de foci p-ATM par cellule et donc les dommages à l'ADN induit par le cisplatine.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Détermination des stades des cancers bronchiques non à petites cellules selon la 8^{ème} édition de la classification TNM.

Tableau 2 : Arbre décisionnel des CBNPCs de stade IV sans altération ciblable.

Tableau 3 : Proportion de tumeurs positives à MUC1 en fonction des différents sous types d'adénocarcinomes pulmonaires.

Tableau 4 : Les cellules exprimant MUC1 sont plus chimiorésistantes au cisplatine.

Tableau 5 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR sensibilise les cellules H1975 et A549 au cisplatine.

Tableau 6 : Séquences des oligonucléotides antisens de type GapmeR testés.

Tableau 7 : Références des anticorps utilisés en western blot.

Tableau 8 : Référence des sondes TaqMan® utilisées.

Annexes :

Annexe 1 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade I.

Annexe 2 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade IIc et IIId résécables et opérables.

Annexe 3 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade IIIa et IIId non éligibles à la chirurgie et IIId.

Annexe 4 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade IVc sans altération ciblable.

Annexe 5 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade métastatique avec mutation activatrice de l'EGFR.

Liste des abréviations :

ABC	ATP Binding Cassette
ADC	Antibody-drug conjugate
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
Apaf-1	Apoptotic peptidase 1
ARN	Acide RiboNucléique
ASO	Antisense Oligonucleotid
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Protein
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ATP7A and B	Cooper-transporting P-type ATPase A and B
ATR	ATM- and Rad3related protein
Bak	Bcl2- homologous antagoniste killer
Bax	Bcl2 associated protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2 protein
Bcl-xL	B-cell Lymphoma-extra-large
BID	BH3 Interacting-domain Death agonist
BiTEs	Bi-specific T-cell engager
BRAF	B-raf proto-oncogene
BRCA 1 / 2	Breast Cancer Susceptibility Protein 1/ 2
CAR-NK	Chimeric Antigen Receptor- NK
CAR-T cells	Chimeric Antigen Receptor-T
CBNPC	Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
CBPC	Cancer Bronchique à Petites Cellules
CD	Cluster Differentiation
DDP	Cisplatine/ cisdiaminedichloroplatine
CDH1	Cyclin D1
Chk1 / 2	Checkpoint Kinase 1/ 2
c-JUN	JUN proto-oncogene
CK	Cystein-Knot
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité.
CRB	Complex Crumbs
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CT	Cytoplasmic Tail
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CTR1/ 2	Cooper Transporter Receptor 1 / 2
CYP450	Cytochrome P450
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	Dendritic Cell
DDR	DNA Damage Response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT1,3b	DNA methyltransferase 1, 3b
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
DO	Densité Optique
DS	Degenerate Signal
ECD	Extracellular Domain
EDTA	Ethylenediaminetetraaceticacid

EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	Epithelial Membrane Antigen
EMA	European Medicines Agency
ER	Estrogen Receptor
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementing group 1
EZH2	Enhancer of Zest Homolog 2
FADD	Fas Associated Death Domain
Fas	Fas Cell surface Death Receptor
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOXF1	Forkhead box 1
Gal-3	Galectin-3
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSH	γ glutamylcysteinyl glycine
HAS	Haute Autorité de Santé
HE	Hématoxyline Éosine
HER2	Human Epidermal growth factor receptor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia-Inductible Factor
HR	Homologous Recombination
HSP70/90	Heat Shock Protein 70/90
IC50	Concentration Inhibitrice 50
IFNγ	Interferon γ
ITK	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
JNK1	c-Jun N-terminale protein Kinase 1
KRAS	V-k-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
LNA	Locked Nucleic Acid
LTCD8	Lymphocyte T CD8
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MDR1	Multidrug Resistance 1
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MET	Mesenchymal-epithelial transition factor
MLH	MutL protein Homologue
MMAE	Monométhyl Auristatine E
MMR	Mismatch Repair
MMOP	Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MRP	Multidrug Resistance Protein
MSH	MutS Homologue
MT1-MMP	Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase
MTS	3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MUC1	Mucine 1
MUC1-C	MUC1 Cytoplasmic domain
MUC1-CT	MUC1 Cytoplasmic Tail
MUC1-FL	MUC1 Full Length
MUC1-N	MUC1 extracellular domain
NER	Nucleotide Excision Repair
NF1	Nuclear Factor 1
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NHEJ	Non Homologous End Joining
NK	Natural Killer
Nup62	Nucleoporin 62
OCT 1/2	Organic Cation Transporter 1/2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD1	Programmed cell Death Protein 1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PD-L1	Programmed cell Death Ligand 1
PEM	Polymorphic Epithelial Mucin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKM2	Pyruvate Kinase M2
PM	Potentiel de Membrane
PRC1/2	Polycomb Repressive Complexe 1/2
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTS	Proline, threonine, serine
PUMA	p53 regulated mediator apoptosis
RASSF1A	RAS Associated Domain Family Member 1
RE	Réticulum Endoplasmique
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Rosewell Park Memorial Institut Medium
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SEA	Sea urchin Sperm protein enterokinase and Agrin domain
SEM	Standard Error of the Mean
SI	Système immunitaire
siRNA	Small Interferent Ribo Nucleic Acid
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SOD	SuperOxyde Dismutase
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2
Sp1	Specificity Protein 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAM	Tumor Associated Macrophage
TBS-T	Tris Buffer Saline - Tween 20
TCR	T Cell Receptor
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TEP	Tomographie à émission de positons
TFIIH	Transcription Factor II H
TGF-β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Tool Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor Protein 53
TR	Tandem Repeat
Treg	T reg Lymphocyte
TWIST1	Twist-related protein 1
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
ZEB1	Zinc Finger E-Box Bindind Homeobox 1

Publications :

Articles de recherche :

Goujon M., Woszczyk J, Gaudelot K, Swierczewski T, **Fellah S**, Gibier JB, Van Seuning I, Larrue R, Cauffiez C, Gnemmi V, Aubert S, Pottier N, Perrais M. (2022). **A Double-Negative Feedback Interaction between miR-21 and PPAR- α in Clear Renal Cell Carcinoma.** *Cancers (Basel)*. 14(3) : 795. <https://doi.org/10.3390/cancers14030795>

Bourdon E., Swierczewski T., **Goujon M.**, Boukrout N., Fellah S., Van der Hauwaert C., Larrue R., Lefebvre B., Van Seuning I., Cauffiez C., Pottier N., Perrais M. (2024). **MUC1 drives the Progression and Chemoresistance of Clear Cell Renal Carcinomas.** *Cancers (Basel)*. 17;16(2):391. <https://doi.org/10.3390/cancers16020391>

Larrue R., Fellah S., Boukrout N., De Sousa C., Lemaire J., Leboeuf C., **Goujon M.**, Perrais M., Mari B., Cauffiez C., Pottier N., Van der Hauwaert C. (2023). **miR-92a-3p regulates cisplatin-induced cancer cell death.** *Cell Death Dis.* 13;14(9):603. <https://doi.org/s41419-023-06125>

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. (2022). **Istradefylline (KW6002) protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin anti-tumor effects.** *J Clin Invest.* 202 132(22) : e152924. <https://doi.org/10.1172/JCI152924>

Communications orales :

Goujon M., Bourdon E., Perrais M. **MUC1 roles on properties of lung cancer cell and cisplatin chemoresistance.** Journée André Verbert, Lille. 13 Novembre 2023.

Goujon M., Bourdon E., Gibier J-B., Perrais M. **Étude du rôle de MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires et dans les phénomènes de chimiorésistance au cisplatine.** PhD Days ONCOLille, mars 2023.

Goujon M., Perrais M. **Étude du rôle de MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires et dans les phénomènes de chimiorésistance au cisplatine.** PhD Days ONCOLille, mars 2022.

Communication affichées (Posters) :

Goujon M., Bourdon E., Perrais M. **Targeting MUC1 in non-small cell lung cancer: impact on cancer cells properties and cisplatin chemoresistance.** Congress Mucins in Health and Disease, Gothenburg (Suède). 17-20 juin 2024.

Goujon M., Bourdon E., Perrais M. **Ciblage de MUC1 dans le carcinome pulmonaire non à petites cellules et étude de l'impact sur les propriétés des cellules cancéreuses et les phénomènes de chimiorésistance au cisplatine.** Journées du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville. 15-17 mai 2024. Sélection pour une communication flash. **2^{ème} prix poster.**

Bourdon E., **Goujon M.**, Gibier J-B., Saidak Z., Perrais M., Brinster C. **Étude du rôle de MUC1 sur le microenvironnement des cellules cancéreuses pulmonaires.** Journées du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville. 15-17 mai 2024.

Goujon M., Bourdon E., Perrais M. **Étude du rôle de MUC1 sur les propriétés dans les cellules cancéreuses pulmonaires et les phénomènes de chimiorésistance au cisplatine.** Journées du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville. 10-12 mai 2023. **Sélection pour une communication flash.**

Goujon M., Gibier J-B., Perrais M. **Study of the role of MUC1 on the properties and phenomena of chemoresistance to cisplatin in lung cancer cells.** ONCOLille days, 02-04 novembre 2022. **Prix du meilleur poster.**

Goujon M., Perrais M, **Étude du rôle de MUC1 sur les propriétés dans les cellules cancéreuses pulmonaires et les phénomènes de chimiorésistance au cisplatine.** Journées du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville. 11-13 mai 2022.

INTRODUCTION

I. Le cancer du poumon.

1) Le poumon :

Situés de part et d'autre du cœur et protégés par la cage thoracique, les poumons servent à la respiration, c'est-à-dire à l'inspiration et à l'expiration, active et automatique, de l'air par contraction du muscle diaphragme. Ils se divisent en un poumon droit et un poumon gauche : le poumon gauche se compose de 2 lobes et le poumon droit de 3 lobes.

L'air inspiré par le nez, arrive dans les poumons après avoir emprunté la trachée. La trachée se divise alors, en 2 bronches souches, une droite et une gauche. Ces bronches souches sont ramifiées en bronches puis en bronchioles. Les bronchioles se terminent en donnant les alvéoles, lieu d'échange gazeux entre l'air et la circulation sanguine (Figure 1).

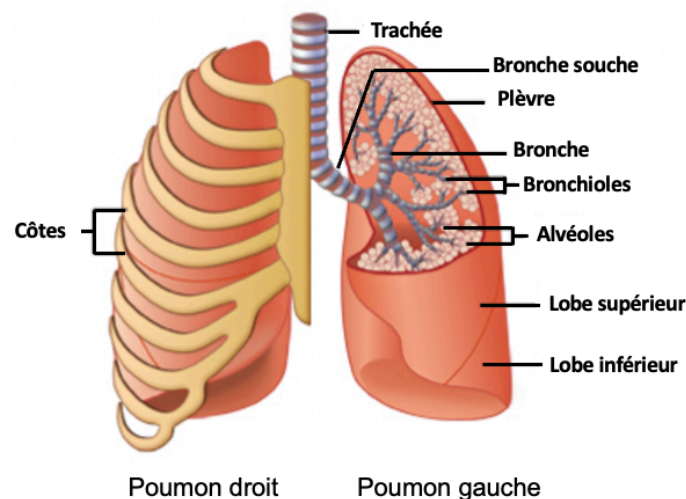


Figure 1 : Anatomie des poumons (Source : Site du Centre de transplantation d'organes du CHU de Lausanne).

2) Épidémiologie :

Le cancer du poumon, aussi appelé cancer bronchique ou cancer bronchopulmonaire, est une maladie des bronches. En 2022, le cancer du poumon demeure la 1^{ère} cause de mortalité par cancer dans le monde (1,8 millions de décès, soit 18,7% des décès par cancer) et est le cancer diagnostiqué le plus fréquemment (2,48 millions de nouveaux cas, soit 12,4% des cancers, soit 1 cancer sur 8) (Bray *et al.*, 2024).

Au niveau national, avec 52 777 nouveaux cas de cancer du poumon diagnostiqués en 2022 (33 438 chez les hommes, 19 339 chez les femmes), il fait partie des cancers les plus fréquents (2^{ème} chez

les hommes, 3^{ème} chez les femmes). L'incidence des cancers bronchiques tend à se stabiliser chez les hommes, mais reste en forte augmentation chez les femmes, avec une progression nette de + 4,3% de nouveaux cas entre 2010 et 2023. Il reste le cancer le plus meurtrier avec 33 100 décès estimés en 2018 et son taux de survie nette standardisée à 5 ans, n'excède pas 20% (Source : Institut National du Cancer, Panorama des Cancers 2023). Des projections définissent le cancer du poumon comme la première cause de mortalité par cancer chez la femme, devant le cancer du sein, d'ici 2030 (Martín-Sánchez *et al.*, 2018).

3) Les facteurs de risques :

Certains facteurs comportementaux, environnementaux et génétiques ont été mis en corrélation avec le développement du cancer du poumon.

Le lien entre tabagisme actif et développement de cancer du poumon a été fait pour la première fois dans les années 1950 par des études épidémiologiques (Doll et Hill., 1950 ; Wynder et Graham., 1950). En effet, la consommation tabagique est le principal facteur de risque du cancer bronchique (multiplie par 20 à 50 fois le risque par rapport à un non-fumeur) (Malhotra *et al.*, 2016) et est responsable de 9 cancers du poumon sur 10 (Alduais *et al.*, 2023). De plus, le risque de développement d'un cancer du poumon est proportionnel à la quantité de cigarettes consommées. La fumée produite par la combustion du tabac contient environ 7 000 substances chimiques, dont au moins 60 sont connues comme étant cancérogènes. Elle permet aussi la production de radicaux libres pouvant agir comme des particules cancérogènes, induisant des adduits à l'ADN. Malgré l'absence de données à court et moyen termes, dû à une mise sur le marché récente, les cigarettes dites électroniques contiennent des substances aromatiques polycycliques pouvant être considérées comme cancérogènes (de Groot *et al.*, 2018). Des études sur des souris exposées aux fumées des cigarettes électroniques montrent qu'elles sont plus sujettes au développement d'adénocarcinomes pulmonaires (Tang *et al.*, 2019).

Au-delà des facteurs comportementaux, des facteurs environnementaux sont significativement associés au développement des cancers bronchiques. L'exposition à l'amiante multiplie par 5 le risque de cancer du poumon chez un non-fumeur et par 50 chez un fumeur (de Groot *et al.*, 2018). Les rayonnements ionisants sont également un facteur de risques, dont le radon, qui selon les projections, serait la 2^{ème} cause de cancer du poumon aux États-Unis (Malhotra *et al.*, 2016). Les hydrocarbures polycycliques aromatiques, la silice, le cadmium ou encore la pollution atmosphérique (émission des

gaz polluants par les véhicules diesel) sont aussi impliqués dans le développement de cancers bronchiques (Source : Institut National du Cancer).

Enfin, des facteurs génétiques ont été identifiés comme facteurs de risque au cancer du poumon. Plusieurs études montrent que les antécédents familiaux de cancer de poumon sont un facteur de risques, d'autant plus qu'ils favorisent des apparitions plus précoces de la maladie (Bailey-Wilson *et al.*, 1993). Des gènes à haute pénétrance ont été identifiés comme favorisant l'apparition de cancer du poumon, comme des mutations du gène suppresseur de tumeurs *TP53*. Des analyses génomiques mettent en évidence des polymorphismes génétiques associés au développement de cancers du poumon. 3 principaux loci ont été identifiés : 15q25, 5p15 et 6p21 (Malhotra *et al.*, 2016).

4) Les sous types histologiques :

Le cancer du poumon se divise en 2 grands sous-types histologiques distincts : le carcinome bronchique à petites cellules (CBPC) et le carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC).

a) Le carcinome bronchique à petites cellules.

Le CBPC représente 15% des cas et est fortement associé à la consommation tabagique. Bien que son incidence soit en déclin depuis quelques années, son taux de survie à 5 ans n'excède pas les 7%. Il se caractérise par une forte agressivité : croissance tumorale rapide, dissémination métastatique dès les stades précoces et une forte instabilité génomique (Meijer *et al.*, 2022). Les cellules rencontrées dans ces tumeurs sont petites, rondes ou fusiformes. Le cytoplasme y est peu abondant et la chromatine granuleuse. L'observation de nécrose y est fréquente (Nooreldeen et Bach., 2021).

b) Le carcinome bronchique non à petites cellules.

Le CBNPC représente 85% des cas de cancer du poumon. De par sa prépondérance, nous nous focaliserons sur ce sous type dans la suite de ce mémoire. Il se divise en 3 principaux sous types histologiques : les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes ou squameux et les carcinomes à grandes cellules (Duma *et al.*, 2019).

i) *Les adénocarcinomes.*

Les adénocarcinomes sont la forme la plus commune de CBNPC. Ils représentent approximativement 40% des cancers du poumon (Duma *et al.*, 2019) et 50% des CBNPC (Boolell *et al.*, 2015). Ils se différencient à partir de muqueuses glandulaires, comme les cellules alvéolaires situées dans l'épithélium des voies respiratoires, ou présentant une production de mucus. D'un point de vue anatomopathologique et selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les adénocarcinomes sont hétérogènes d'un point de vue histologique. Ils peuvent être : lépidique (Figure 2A), acineux (Figure 2B), papillaire (Figure 2C), micro-papillaire (Figure 2D), solide (Figure 2E), mucineux ou non mucineux (ou encore mixte) ... (Zheng *et al.*, 2016). Cette hétérogénéité influence la survie des patients : les adénocarcinomes lépidiques, acineux et papillaires présentent une meilleure survie que les adénocarcinomes solides ou micropapillaires (Eguchi *et al.*, 2015). Ils ont tous un potentiel métastatique accru, et sont plus fréquemment retrouvés chez les fumeurs et les femmes.

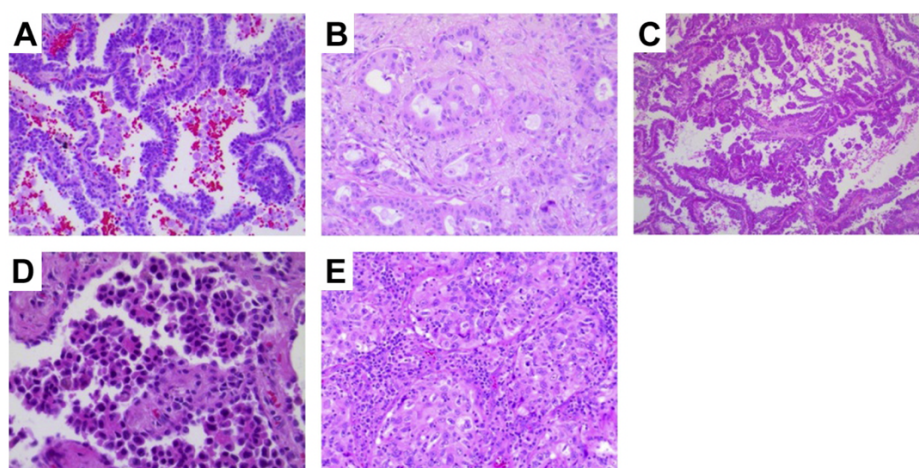


Figure 2 : Coupes histologiques d'adénocarcinomes pulmonaires. **A)** Adénocarcinome lépidique (HE x200), **B)** Adénocarcinome acineux (HE x200), **C)** Adénocarcinome papillaire (HE x200), **D)** Adénocarcinome micropapillaire (HE x200) et **E)** Adénocarcinome solide (HE x100), d'après Zheng *et al.*, 2016.

ii) *Les carcinomes épidermoïdes ou squameux.*

Les carcinomes épidermoïdes ou squameux représentent 25 à 30% des CBNPC (Alduais *et al.*, 2023), bien que leur incidence soit en déclin. Ils se développent majoritairement le long des voies respiratoires principales (bronches lobaires ou principales) et peuvent former des cavités lorsqu'ils atteignent des tailles importantes. Ils peuvent être kératinisés (Figure 3A) ou non (Figure 3B) (Zheng *et al.*, 2016).

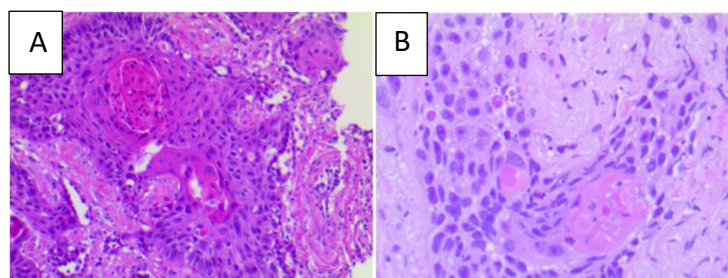


Figure 3 : Coupes histologiques de carcinomes épidermoïdes ou squameux. **A)** Carcinome épidermoïdes kératinisé et **B)** Carcinome épidermoïde non kératinisé, d'après Zheng *et al.*, 2016.

iii) Les carcinomes à grandes cellules.

Les carcinomes à grandes cellules sont une forme minoritaire de cancer bronchique, et représentent 5 à 10% des CBNPC (Alduais *et al.*, 2023). Il s'agit d'un classement dit « d'exclusion », car ils regroupent les tumeurs ne pouvant être associées aux adénocarcinomes, aux carcinomes épidermoïdes ou aux carcinomes neuroendocrines. Ils se développent en périphérie, bien qu'ils n'aient pas de sites préférentiels dans le poumon. Ils sont très volumineux, présentent une croissance rapide et sont d'aspect nécrotique (Zheng *et al.*, 2016).

5) Le diagnostic :

Malgré les nombreuses avancées dans le diagnostic des cancers et la découverte de nouveaux biomarqueurs, la majorité des cancers du poumon sont diagnostiqués à des stades localement avancés ou métastatiques, dû à l'absence de symptômes spécifiques dans les stades précoces. En effet, les symptômes les plus fréquents combinent des problèmes respiratoires déjà rencontrés chez les fumeurs (toux persistante, expectorations sanguinolentes...), des douleurs thoraciques et une altération de l'état général (Quanyang *et al.*, 2024). Pourtant le diagnostic précoce de la pathologie est crucial afin de permettre une prise en charge optimale, en particulier dans les populations à risques (Nooreldeen et Bach., 2021). C'est pourquoi le développement de nouveaux outils diagnostiques efficaces suscite beaucoup d'intérêt.

Le diagnostic d'un cancer bronchique peut être réalisé, de manière fortuite au cours d'un examen d'imagerie médical effectué pour une potentielle autre pathologie. Une fois le cancer détecté, le bilan diagnostique repose sur un examen clinique, le recours à des techniques d'imageries telles que la radiographie, le scanner et la tomographie à émission de positons (TEP) et des examens

tissulaires/biologiques pour confirmation histologique (Source : Institut National du Cancer, Les traitements du cancer du poumon, 2017).

Aux États-Unis, afin de permettre une prise en charge précoce des patients et d'améliorer le taux de survie des patients, des campagnes de dépistages tests, remboursées, existent et concernent les populations dites à « Hauts risques ». Ces dépistages précoces ont permis de diminuer de 20% la mortalité par cancer du poumon, des personnes dépistées précocement. En France, il n'existe pas de systèmes de dépistage similaire pour le cancer du poumon (sauf dans le cas d'exposition à des facteurs de risques au niveau professionnel) (Alexander *et al.*, 2020 ; Nooreldeen et Bach., 2021).

6) Les différents stades :

La classification TNM permet de rendre compte du stade d'un cancer. Cette classification repose sur 3 paramètres : la taille de la tumeur (T), la propagation de la tumeur aux ganglions lymphatiques environnants (N) et la présence ou non de métastases (M). La taille des tumeurs est classée de T1 à T4 et l'atteinte des ganglions lymphatiques est classée de N0 à N3. L'absence de métastases est notée M0 et la présence de métastases est notée M1 (Nooreldeen et Bach., 2021). Afin de permettre une meilleure prise en charge des patients, cette classification est régulièrement révisée. Depuis sa dernière mise à jour, un nouveau paramètre est pris en compte : l'invasion de la couche pleurale (classée de PL0 à PL2). En effet, Shimizu *et al.* montrent que l'invasion de la couche pleurale est un marqueur de mauvais pronostic (Shimizu *et al.*, 2005). Ces paramètres pris en compte permettent de définir le stade de la tumeur, allant du stade I, le moins avancé ou localisé dans le thorax, au stade IV, le plus avancé, ou métastatique (Rami-Porta., 2021). Cette stratification présente un intérêt pronostique majeur et permettra d'orienter la ligne thérapeutique choisie par le praticien (Tableau 1).

Stade	Taille tumeur (T)	Atteinte ganglions lymphatiques (N)	Métastase (M)
0	T in situ	N0	M0
Ia	T1a (≤1cm) T1b (>1-2 cm) T1c (>2-3cm)	N0 (pas d'atteinte ganglionnaire) N0 N0	M0 M0 M0
Ib	T2a (>3-4cm)	N0	M0
IIa	T1a, b, c T2b(>4-5cm)	N1 (ganglions péribronchiques ou hilaires, intrapleuraux) N0	M0 M0
IIb	T1a, b, c T2a, b T3 (>5-7cm)	N2a (1 ganglion médiastinal homolatéral ou ganglion sub-carénaire atteint) N1 N0	M0 M0 M0
IIIa	T1a, b, c T2a, b T3 T4(>7cm)	N2b (plusieurs ganglions médiastinaux homolatéraux ou ganglions sub-carénaires atteints) N1 N1, N2a N0, N1	M0 M0 M0 M0
IIIb	T1a, b, c T2a, b T2a, b T3 T4	N3 (atteintes ganglionnaires médiastinales ou hilaires controlatérales ou scaléniques, sus-claviculaires homo ou controlatérales) N2b N3 N2b N2a, b	M0 M0 M0 M0
IIIc	T3 T4	N3 N3	M0 M0
IVa	T1a, b, c T2 a, b T3 T4	TOUT N confondus	M1a, b (a : 1 métastase dans le lobe controlatéral ou dans médiastin b : 1 métastase extra-thoracique dans un seul organe)
IVb	T1a, b, c T2 a, b T3 T4	TOUT N confondus	M1c1 et M1c2 (c1 : plusieurs métastases extra-thoraciques dans un seul organe c2 : plusieurs métastases extra-thoraciques dans plusieurs organes)

Tableau 1 : Détermination des stades des cancers bronchiques non à petites cellules selon la 8^{ème} édition de la classification TNM, d'après Rami-Porta., 2021.

II. Les lignes de traitement.

Le cancer du poumon est une maladie hétérogène d'un point de vue clinique, histologique et moléculaire. La prise en charge sera cas-spécifique. Le choix et l'ordre des traitements pour les patients atteints de CBNPC dépend du stade, défini par la classification TNM (Tableau 1) et dépend de sa localisation. La prise en charge repose sur la chirurgie, la radiothérapie conventionnelle ou stéréotaxique, et sur les traitements médicamenteux (thérapies ciblées, immunothérapies et chimiothérapies conventionnelles) (Duma *et al.*, 2019). Ces différents traitements peuvent être donnés seuls ou en combinaison.

1) La chirurgie :

La chirurgie demeure le traitement de référence dans la prise en charge des CBNPCs et le plus efficace, car il permet l'exérèse de la tumeur et des éventuels ganglions lymphatiques touchés. La chirurgie ne concerne que les stades précoces de la maladie : stade I, II a, b et le stade IIIa, soit 20 à 25% des patients (Nagasaka et Gadgil, 2018). 70% des tumeurs détectées à un stade précoce sont résécables chirurgicalement (Zheng *et al.*, 2016). Plusieurs approches chirurgicales peuvent être envisagées, selon le type et la localisation de la tumeur : la lobectomie qui repose sur l'ablation du lobe touché, la résection partielle qui consiste à enlever la tumeur et les tissus sains environnants, la segmentectomie qui repose sur le retrait d'une partie du lobe et la pneumonectomie qui correspond à l'ablation d'un des deux poumons, lorsque la tumeur est proche du cœur (Alduais *et al.*, 2023). Néanmoins, de nombreux patients opérés sont susceptibles de développer des métastases à distance ou des récidives locales (cas des stades II et IIIa). De manière préventive, en post-opératoire, un traitement adjuvant tel que la radiothérapie, la chimiothérapie ou une thérapie ciblée est envisagé. Majoritairement, les patients reçoivent une chimiothérapie à base de sels de platine afin d'éliminer les éventuelles cellules cancéreuses restantes (diminue le risque de mortalité à 5 ans de 5,4%).

Les tumeurs localement avancées (défini par la classification TNM comme au-delà du stade III) sont définies comme non opérables, hors cas exceptionnels. La norme de soins actuelle est une chimiothérapie (à base de sels de platine) suivie d'une immunothérapie (PD-L1 $\geq 50\%$) (Alexander *et al.*, 2020). De la radiothérapie peut être envisagée suivant l'étendue des lésions. Si des mutations spécifiques sont identifiées, les patients peuvent se voir proposés des thérapies ciblées (Duma *et al.*, 2019).

2) La radiothérapie :

La radiothérapie est un traitement loco-régional. Elle utilise des rayons de haute intensité qui présentent la capacité d'induire des dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses, entraînant ainsi leur mort. Ce type de traitement permet d'inhiber la progression tumorale mais aussi d'éliminer les cellules tumorales, dans des parties spécifiques du corps humain. Il existe différents types de radiothérapie mais la radiothérapie conformationnelle 3D et la radiothérapie stéréotaxique sont les plus couramment utilisées en routine clinique. Le recours à la radiothérapie n'est pas systématique dans le schéma de prise en charge des CBNPCs (Alduais *et al.*, 2023). La radiothérapie stéréotaxique est utilisée de manière curative pour les patients atteints de stade précoce (stade I). Elle peut être dispensée dans certaines tumeurs de stade IIIa dites opérables et résécables, lorsque la résection n'a pas été complète. Les stades IIIa et IIIb non résécables et non opérables, sont traités en combinant la chimiothérapie et la radiothérapie, suivie d'une immunothérapie si le patient y est éligible (Goldstraw *et al.*, 2011).

De manière générale, la radiothérapie reste palliative : le recours à la radiothérapie concerne les patients présentant des stades précoces de CBNPCs, les patients insensibles à la chirurgie ou à la chimiothérapie et les patients présentant des tumeurs résécables non éligibles à la chirurgie.

3) Les thérapies ciblées :

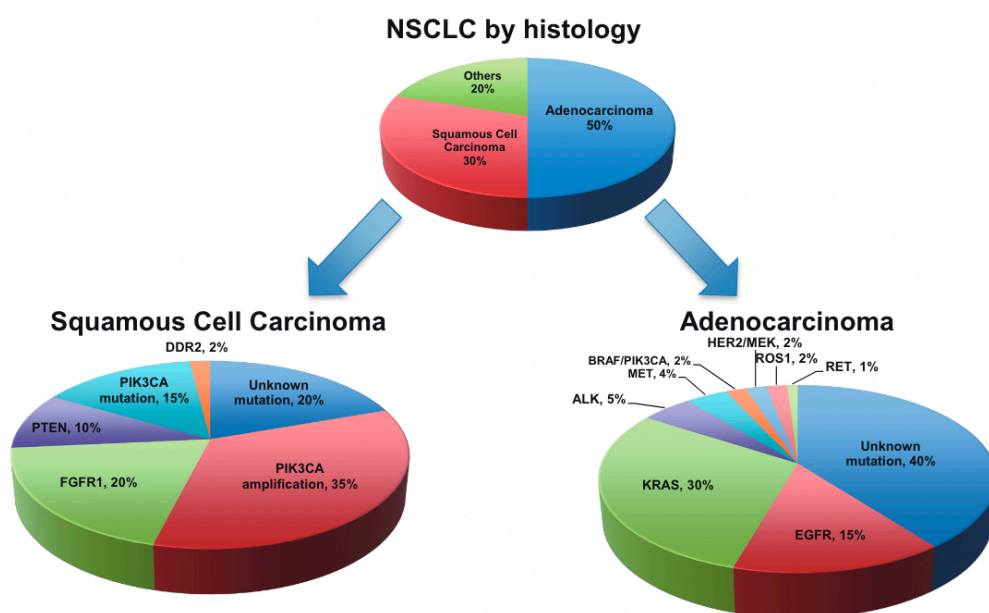


Figure 4 : Répartition des « drivers oncogéniques » identifiés dans les différents sous-types de CBNPCs, d'après Chan et Hughes., 2015.

Le CBNPC est une pathologie hétérogène d'un point de vue génétique : en effet, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence des mutations somatiques devenant ainsi des « drivers oncogéniques ». Les gènes les plus fréquemment mutés sont celui de l'*EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (10-30%), *KRAS* (*V-ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*) (10-30%), *MET* (*Mesenchymal-Epithelial Transition Receptor*) (4%), *BRAF* (*B-raf proto-oncogene*) (1-3%) et la fusion des gènes *EML4-ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) (3%) (Figure 4) (Testa *et al.*, 2018). Ces mutations sont connues comme étant activatrices des gènes de récepteurs aux facteurs de croissance et, par conséquent, des voies de transduction intracellulaires associées. Ainsi de nouvelles thérapies sont apparues, cherchant à inhiber la suractivation de ces récepteurs et des voies associées : les inhibiteurs de tyrosines kinases (ITK) et les anticorps monoclonaux. L'avantage des ITK est qu'ils ciblent uniquement les cellules cancéreuses, ralentissant leur progression et leur propagation, tout en épargnant les cellules saines (Alduais *et al.*, 2023). Ainsi, la stratégie thérapeutique ne repose plus uniquement sur le stade et l'histologie de la tumeur. L'identification de ces « drivers oncogéniques » repose sur un diagnostic moléculaire propre à chaque tumeur.

La surexpression de l'*EGFR* est fortement retrouvée dans les CBNPCs et dans 15% des adénocarcinomes pulmonaires, ce qui en fait une cible intéressante. Cet attrait a été d'autant plus renforcé après la découverte des mutations activatrices de ce récepteur en 2004 (Gálffy *et al.*, 2024). Il appartient à la famille des récepteurs à tyrosines kinases, qui sont capables d'activer une vaste gamme de voies de signalisation impliquées dans la croissance, la prolifération et la survie (MAPK, PI3k-AKT, RAS-RAF-MEK-ERK) (Chan et Hughes., 2015). Les *EGFR* mutants peuvent être inhibés par de petites molécules (ITK) ou par des anticorps (Cetuximab et Necitumumab). Les ITK existants pour traiter le cancer du poumon sont l'Erlotinib et le Gefitinib, l'Afatinib et Dacomitinib et enfin l'Osimertinib. Ils sont respectivement classés en 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération d'ITK. L'Erlotinib et le Gefitinib sont des inhibiteurs compétitifs réversibles de l'ATP, pour le domaine tyrosine kinase de l'*EGFR*, empêchant ainsi l'activation des voies de signalisation en aval. L'Afatinib et le Dacomitinib sont des inhibiteurs plus puissants de l'*EGFR* et de HER2, formant une liaison irréversible. Des études ont montré de bons résultats avec les inhibiteurs de 1^{ère} et 2^{ème} génération, mais au-delà de 6-12 mois de traitement, des phénomènes de résistance surviennent dans 50 à 60% des cas (Duma *et al.*, 2019 ; Gálffy *et al.*, 2024). Les ITK de 1^{ère} et 2^{ème} génération ont été remplacés par l'Osimertinib, un inhibiteur de 3^{ème} génération, qui présente un meilleur taux de survie sans progression (Soria *et al.*, 2018). Le traitement type des stades Ib à IIIa avec mutation *EGFR*, ayant subi une résection tumorale complète est : chirurgie, chimiothérapie adjuvante et Osimertinib (Gálffy *et al.*, 2024).

Les réarrangements dans le gène *ALK* sont retrouvés dans environ 5 à 7% des adénocarcinomes pulmonaires. La fusion des gènes *EML4-ALK* entraîne une activation constitutive d'*ALK*, connue comme jouant un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses (Boolell *et al.*, 2015). La détection de l'oncogène de fusion *ALK* est d'une grande importance, car les tumeurs *ALK* positives sont très sensibles aux inhibiteurs-*ALK*, ce qui améliore considérablement l'espérance de vie des patients (Gálffy *et al.*, 2024). Comme pour les inhibiteurs EGFR, plusieurs générations d'inhibiteurs *ALK* sont disponibles. Le Crizotinib (initialement un inhibiteur de c-MET) est un inhibiteur de 1^{ère} génération, qui entraîne un arrêt de la cellule en phase G1/S du cycle cellulaire et induit l'apoptose. L'acquisition de résistances a entraîné le développement d'inhibiteurs de 2^{ème} génération. Parmi ces inhibiteurs de 2^{ème} génération, on retrouve le Ceritinib qui augmente la survie sans progression de 8,5 mois quand il est utilisé en traitement de 1^{ère} ligne, en comparaison avec une chimiothérapie classique et l'Alectinib, qui peut être donné en 1^{ère} ligne de traitement ou aux patients ayant présenté une progression sous Crizotinib (Duma *et al.*, 2019 ; Gálffy *et al.*, 2024). Lorlatinib est un inhibiteur de 3^{ème} génération qui agit sur toutes les mutations *ALK* impliquées dans la résistance. Il est donc destiné aux patients ayant des tumeurs *ALK* positives, qui ont développé des résistances à l'Alectinib, au Crizotinib ou au Céritinib. Il est recommandé en monothérapie pour les patients aux tumeurs *ALK* positives n'ayant jamais été traité par un inhibiteur *ALK* (Gálffy *et al.*, 2024).

Des mutations de *MET*, le récepteur à l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), sont observables dans 3 à 4% des adénocarcinomes pulmonaires. La perte de l'exon 14 de *MET* et l'augmentation de la signalisation de *MET* sont causées par des perturbations au niveau du site d'épissage du proto-oncogène de *MET*. Ces dérégulations favorisent la progression tumorale, la survie, l'invasion, la résistance à l'apoptose et la formation de métastases (Chen et Hughes., 2015). La FDA (Food and Drug Administration) a approuvé le Capmatinib et le Tépotinib comme traitement de première ligne des CBNPCs avec un saut de l'exon 14 de *MET*, mais l'EMA (Agence Européenne du Médicament) ne les a approuvés qu'en traitements de deuxième intention. Néanmoins, dans le cas de saut de l'exon 14 de *MET*, la chimiothérapie à base de sels de platine reste le traitement de référence (Gálffy *et al.*, 2024).

Les mutations activatrices de *KRAS* sont retrouvées dans environ 25% des adénocarcinomes pulmonaires et sont imputables au tabagisme. Aujourd'hui, l'essentiel des thérapies visant *KRAS* se concentre sur le ciblage de la mutation *KRAS G12C* qui représente plus de 50% des mutations de *KRAS* (Rosell *et al.*, 2024). Le Sotorasib est le premier agent cible à recevoir une autorisation réglementaire pour le traitement de l'adénocarcinome localement avancé ou métastatique, mutant *KRAS G12C* chez les patients ayant reçu au moins un traitement systémique antérieur (Gálffy *et al.*, 2024).

D'autres mutations plus ponctuelles peuvent également être ciblées. On peut citer les mutations de *BRAF*, bien qu'elles soient peu communes dans les CBNPCs (1-3% des cas). La mutation la plus fréquente est *BRAF V600E* et un traitement combinatoire a été approuvé pour cibler cette mutation (Boolell *et al.*, 2015). Cependant, il ne va concerner que les personnes ayant la mutation et ayant eu une progression sous chimiothérapie en 1^{ère} intention. Il combine le Dabrafénib, un inhibiteur sérine/thréonine kinase, et le Tramétinib, un inhibiteur sérine/thréonine kinase et inhibiteur de l'activité tyrosine kinase (Gálffy *et al.*, 2024). Le Vemurafenib possède une activité intéressante dans le cancer du poumon avec 45% de réponse en monothérapie (Alduais *et al.*, 2023).

Dans environ 20 à 40% des CBNPCs, aucune mutation somatique notable n'est mise en évidence, rendant le recours aux thérapies ciblées inefficaces. De ce fait, il est nécessaire de définir de nouvelles cibles et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

4) Les immunothérapies :

Le système immunitaire (SI) joue un rôle fondamental dans la surveillance, la reconnaissance et la destruction des cellules néoplasiques, avant qu'elles ne deviennent cliniquement significatives. Les cellules cancéreuses possèdent la capacité d'échapper à la surveillance immunitaire, leur permettant, ainsi, de prospérer. Les principales voies impliquées sont la voie PD1/PD-L1 (Programmed cell Death Protein/ Programmed cell Death Ligand 1) et la voie CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) (Duma *et al.*, 2019). Toutes deux sont qualifiées « d'immune checkpoint » (Figure 5).

L'immunothérapie a pour objectif de renforcer les défenses immunitaires anti-cancéreuses inhérentes au corps humain, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, ciblant des antigènes spécifiques. Parmi les voies potentiellement blocables, la voie PD1/PD-L1 est particulièrement étudiée. Il est reconnu que les cellules cancéreuses peuvent sur-exprimer PD-L1 à leur surface comme mécanisme de défense contre le SI de l'hôte (Boolell *et al.*, 2017 a). PD1 est exprimée à la surface de nombreux types cellulaires, mais en particulier les cellules T cytotoxiques. L'interaction entre PD1 et PD-L1 induit l'inactivation des cellules T, empêchant ainsi la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses (Figure 5A). L'objectif de l'immunothérapie est de bloquer cette interaction, afin de restaurer l'activité des cellules T effectrices. A cette fin, différents anticorps monoclonaux humanisés ont été développés au cours de cette dernière décennie et se sont révélés particulièrement efficaces dans les CBNPCs, car ils ralentissent ou stoppent leur progression (Figure 5B) (Duma *et al.*, 2019 ;

Alduais *et al.*, 2023). Parmi les anticorps développés, trois sont approuvés par la FDA : l'Atezolizumab, le Pembrolizumab et le Nivolumab, dont les deux derniers sont des drogues bloquant PD1 (Alduais *et al.*, 2023). Dans le traitement des CBNPCs, ces anticorps peuvent être utilisés en monothérapie, en combinaison d'immunothérapies et en combinaison immunothérapie + chimiothérapie, ou encore plus récemment, en combinant plusieurs immunothérapies avec de la chimiothérapie (Reck *et al.*, 2022). Le Pembrolizumab est approuvé pour les patients avec des tumeurs PD-L1 positives (> 50%) à stade avancé ou non résécables. En monothérapie, des études montrent que le Pembrolizumab, chez les patients avec un score PD-L1 $\geq 50\%$, induit une meilleure survie globale et une meilleure survie sans progression, en comparaison à une chimiothérapie (Duma *et al.*, 2019). Lors d'un traitement par combinaison Pembrolizumab et chimiothérapie à base de sels de platine, les résultats montrent une augmentation de l'efficacité du traitement, en comparaison à une chimiothérapie seule, dans des CBNPCs métastatiques (Gandhi *et al.*, 2018 ; Paz-Ares *et al.*, 2018). Néanmoins que ça soit en monothérapie ou en combinaison, l'éligibilité des patients reste limitée. De plus, les résultats sont directement corrélés à l'expression de PD-L1. Le Nivolumab est régulièrement utilisé comme traitement de deuxième intention chez les patients atteints de CBNPCs métastatiques dont l'état s'aggrave pendant ou après une chimiothérapie à base de sels de platine (Borghaei *et al.*, 2021).

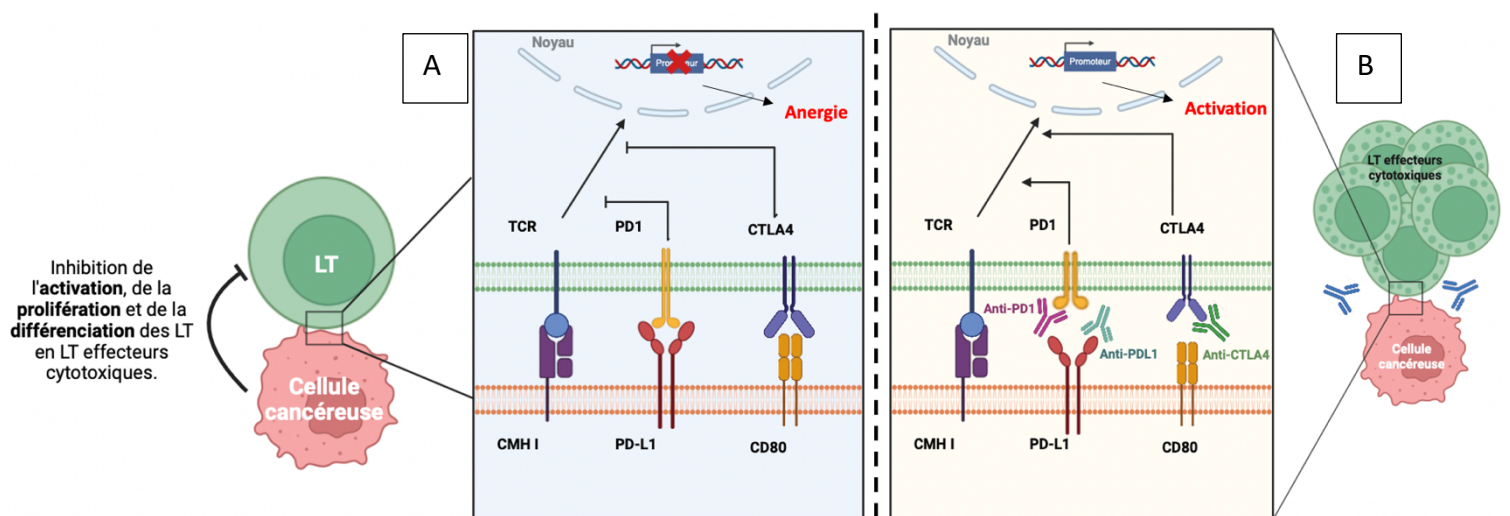


Figure 5 : Le ciblage des « Immune Checkpoint » PD-L1 et CTLA4 favorise l'activation cytotoxique des lymphocytes T ainsi que la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses. **A)** Mode d'action des « immune checkpoint » empêchant l'activation des cellules T effectrices. **B)** Principe de fonctionnement des immunothérapies développées au cours des dernières années. TCR : T Cell Receptor ; CMH I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité ; PD-L1 : Programmed cell Death Ligand 1 ; PD1 : Programmed cell Death 1 ; CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4 ; CD80 : Cluster Differentiation 80.

CTLA4 est un point de contrôle du SI exprimé à la surface des cellules T où il fonctionne comme un récepteur. Son activation envoie un signal inhibiteur qui module l'activation, la prolifération mais aussi les fonctions effectrices des cellules T effectrices (Figure 5A) (Duma *et al.*, 2019). L'Ipilimumab, un anticorps monoclonal humanisé, a été développé pour bloquer CTLA4 et empêcher son activation. Il facilite alors l'activation des cellules T et potentialise leurs effets antitumoraux (Figure 5B) (Boolell *et al.*, 2015). Aujourd'hui, il est possible de combiner un anti-PDL1 avec un inhibiteur de CTLA4. Cette bithérapie permet d'augmenter l'immunité antitumorale chez les patients atteints de mélanome malin (Hellman *et al.*, 2018) mais aussi dans les CBNPCs (Yang *et al.*, 2023).

Cette dernière décennie a été caractérisée par un progrès décisif des immunothérapies dans la prise en charge des CBNPCs, contribuant à une amélioration non négligeable de la survie. Avant, l'immunothérapie en monothérapie était un traitement de 2^{ème} intention. Aujourd'hui, les progrès récents et les nombreuses études tendent à l'utilisation des approches combinées en traitement de 1^{ère} ligne, ainsi qu'à l'intégration des immunothérapies à des stades plus précoces (Reck *et al.*, 2022). Néanmoins, ces thérapies ne vont concerner qu'un faible nombre de patients, les taux de réponse sont de l'ordre de 20 à 40% en monothérapie et des résistances se développeront dans 60% des cas (Memon *et al.*, 2024).

5) Les chimiothérapies :

Bien que découvertes par Paul Ehrlich au début du XX^{ème} siècle, les chimiothérapies n'ont été utilisées de manière courante dans le traitement du cancer qu'après les années 1960. En effet avant 1960, l'essentiel des traitements reposaient sur des traitements locaux tels que la chirurgie et la radiothérapie. En raison du développement de micro-métastases, les taux de guérisons ne dépassaient malheureusement pas 33 %, rendant nécessaire l'émergence de nouvelles thérapies systémiques, dont la chimiothérapie adjuvante (DeVita et Chu., 2008).

Aujourd'hui, malgré le développement et l'essor de nouvelles modalités de traitements prometteuses des cancers (thérapies ciblées et immunothérapies), la chimiothérapie reste le traitement de 1^{ère} intention de référence dans de nombreux cancer y compris les CBNPCs (Tilsed *et al.*, 2022). En effet, toutes les études associant des immunothérapies ou thérapies ciblées avec de la chimiothérapie montrent de meilleurs résultats (Schmidt *et al.*, 2020). Chez de nombreux patients, aucun « driver oncogénique » ne peut être identifié, dans ce cas la chimiothérapie demeure le soin standard (notamment celle à base de sels de platine) (Boolell *et al.*, 2015). Elle peut être prescrite de

manière néoadjuvante, afin de diminuer la taille de la tumeur et permettre sa résection, ou alors de manière adjuvante, afin de limiter les rechutes et le développement de métastases à distance. La combinaison chirurgie suivie d'une chimiothérapie adjuvante chez les patients atteints d'un stade précoce diminue de 13% le risque de décès (Goldstraw *et al.*, 2011 ; Duma *et al.*, 2019). Elle est toujours définie, en 2024, comme un des traitements de référence, au même titre que les immunothérapies, des CBNPCs de stade IV, afin de cibler les métastases. La chimiothérapie peut être donnée en combinaison avec de la radiothérapie pour obtenir de meilleurs résultats (Tilsed *et al.*, 2022).

La chimiothérapie est un type de médication à visée systémique, qui a pour objectif de détruire les cellules cancéreuses en inhibant la croissance, la division et la prolifération de ces dernières. La chimiothérapie est aussi qualifiée de « cytotoxique ». Les agents cytotoxiques employés ciblent toutes les cellules à prolifération rapide dont les cellules cancéreuses, mais aussi certaines cellules saines à croissance rapide comme les cellules de la moëlle osseuse, de la paroi intestinale, des poils et des cheveux, engendrant des effets indésirables. Malgré les effets indésirables imputables à la chimiothérapie, il a été largement prouvé qu'elle prolongeait la durée de vie et améliorait la qualité de vie des patients atteints de cancer bronchique, et ceci, quel que soit le stade de la pathologie (Alduais *et al.*, 2023).

La chimiothérapie conventionnelle se divise en plusieurs classes, en fonction de leur mécanisme d'action principal : les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases, les poisons microtubulaires (les taxanes et les alcaloïdes) et les agents alkylants (Tilsed *et al.*, 2022).

a) Les antimétabolites.

Les antimétabolites sont utilisés en chimiothérapie anticancéreuse, et plus précisément les antagonistes foliques, les antagonistes pyrimidiques ou puriques ou analogues des purines. Les antimétabolites sont des analogues structuraux des bases nucléiques, qui s'incorporent à l'ADN à la place des bases puriques ou pyrimidiques, ou encore, qui peuvent inhiber les voies de synthèse de ces bases. Ils vont donc inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN et de leurs composants (Tilsed *et al.*, 2022). Parmi les antimétabolites, on retrouve le 5-Fluorouracile, la gemcitabine ou le pemetrexed.

L'association cisplatine plus gemcitabine, un antimétabolite analogue des bases pyrimidiques, est le traitement de référence dans la prise en charge des CBNPCs avancés ou métastatiques. De plus, les patients possèdent une meilleure tolérance à cette combinaison qu'à l'association pemetrexed/carboplatine (Scagliotti *et al.*, 2023 ; Ryu *et al.*, 2011). Dans certains cas

d'adénocarcinomes pulmonaires de stade III, le pemetrexed, un antimétabolite du folate, est utilisé seul ou en association avec du cisplatine (Boolell *et al.*, 2015).

b) Les inhibiteurs de topoisomérases.

Les topoisomérases sont des enzymes retrouvées dans le noyau des cellules normales et cancéreuses, impliquées dans le relâchement et déroulement de la molécule d'ADN, après induction transitoires de cassures simples brins (topoisomérase I) et de cassures doubles brins (topoisomérase II). Les inhibiteurs de topoisomérases agissent en bloquant ces enzymes. Ceci empêche la ligation des cassures simples et doubles brins induites, conduit à leur accumulation, à l'inhibition de la réplication et à la mort de la cellule par apoptose.

Parmi les inhibiteurs de topoisomérases présents sur le marché, on peut citer l'Irinotécan et le Topotécan. Tous deux sont des inhibiteurs de la topoisomérase I, empêchant ainsi la ligation des cassures simple brins. Ils sont tous deux utilisés en chimiothérapie adjuvante dans les CBNPCs. On peut citer également l'étoposide, le téniposide et la doxorubicine, des inhibiteurs de la topoisomérase II, dont l'étoposide et la doxorubicine sont utilisés couramment en chimiothérapie adjuvante dans les CBNPCs (Tilsed *et al.*, 2022 ; LiverTox.NIH.gov).

c) Les agents antimicrotubulaires.

Les agents antimicrotubulaires ou poisons du fuseau interfèrent avec les microtubules, des filaments du cytosquelette indispensables à la formation du fuseau mitotique, permettant la ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire et impliqués dans le trafic intracellulaire (Mukhtar *et al.*, 2014). Ces agents antimicrotubulaires sont de 2 types : les taxanes et les alcaloïdes, et vont bloquer l'instabilité dynamique des microtubules.

i) Les taxanes.

Les taxanes sont des dérivés hémi-synthétiques ou natifs de l'if. Ils empêchent la dépolymérisation de la tubuline cytoplasmique, en se fixant à la surface des microtubules. Les microtubules sont alors rigidifiés et polymérisés, aboutissant à la mort de la cellule pendant la phase M (mitose) (Tilsed *et al.*, 2022 et source : Site du Collège National de la Pharmacologie médicale). Les taxanes les plus connus sont le paclitaxel et le docétaxel.

Le premier est couramment utilisé en association avec des sels de platine, tel que le cisplatine, dans le CBNPC ne pouvant être traité par chirurgie ou radiothérapie. Selon la Commission de Transparence de la Haute Autorité de Santé (HAS), le docétaxel est indiqué dans le traitement des CBNPCs localement avancés après l'échec d'une chimiothérapie administrée en 1^{ère} intention. Dans le cas des CBNPCs non résecables, localement avancés ou métastatiques, la HAS recommande la combinaison du docétaxel et du cisplatine, sans chimiothérapie antérieure (Source : HAS).

ii) Les alcaloïdes.

Les alcaloïdes ou vinca-alcaloïdes, isolés de la feuille de pervenche, sont les plus anciennes molécules développées pour perturber les microtubules et sont des inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline (sous unités composant les microtubules). Leurs effets sont doses dépendantes : à hautes concentrations, ils dépolymérisent les microtubules et induisent la destruction des fuseaux mitotiques, laissant les cellules cancéreuses en division bloquées en mitose avec des chromosomes fortement condensés ; à basses concentrations, ils sont responsables du blocage de la mitose, dû à la suppression de la dynamique des microtubules, conduisant à l'apoptose des cellules (Mukhtar *et al.*, 2014). Seule la vinorelbine est utilisée dans le CBNPC, en monothérapie.

d) Les agents alkylants.

Les agents alkylants ont la capacité de former des liaisons covalentes directes avec l'ADN. Ces liaisons génèrent un encombrement stérique, empêchant l'accès des polymérases à l'ADN, bloquant ainsi la réplication de l'ADN et la transcription de l'ARN. Ils peuvent également induire des cassures simples ou doubles brins de l'ADN. La multiplication des cassures conduit à l'accumulation d'expression de facteurs pro-apoptotiques, pour *in fine* aboutir à la mort cellulaire par apoptose.

Les agents alkylants sont de différents types. On peut citer la cyclophosphamide et la mitomycine qui induisent des dommages à l'ADN en transférant des groupements alkyles à l'ADN afin de générer des cassures simples et doubles brins. On distingue les anthracyclines qui sont des intercalants de l'ADN. Et enfin, on retrouve les agents alkylants dérivés du platine tel que le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine (Tilsed *et al.*, 2022). Dans le CBNPC, plusieurs familles d'agents alkylants sont utilisées en clinique dont majoritairement les dérivés du platine, tel que le cisplatine. Ils sont utilisables quel que soit le stade : pour les stades précoces, la chimiothérapie à base de sels de platine peut être utilisée avant ou après la chirurgie ou en traitement de 1^{ère} intention dans le cas des tumeurs

non résécables, seule ou en association avec d'autres traitements. Pour les stades avancés ou métastatiques, elles demeurent le traitement de référence (Alduais *et al.*, 2023).

Tous ces agents cytotoxiques présentent des actions principales mais possèdent également des mécanismes d'action secondaires, renforçant ainsi leurs effets cytotoxiques. Les agents antimicrotubulaires altèrent la signalisation cellulaire ainsi que le trafic intracellulaire médié par les microtubules. Ils inhibent la migration et l'invasion et empêchent la vascularisation de la tumeur. Les inhibiteurs de topoisomérases produisent des espèces réactives à l'oxygène (ROS). Le ciblage de la topoisomérase II empêche la biogenèse mitochondriale et induit la mort cellulaire des cellules non proliférantes. Les agents alkylants affectent l'ARN, les lipides et l'ADN mitochondrial et génèrent des ROS.

Aujourd'hui, les nombreuses avancées dans la prise en charge des cancers pulmonaires permettent de proposer des thérapies adaptées à chaque patient, tendant de plus à plus vers une médecine personnalisée. Le choix du traitement est discuté au cours d'une Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP), qui regroupe au moins 3 médecins de spécialités différentes, en tenant compte du stade du cancer selon la classification TNM, de la présence ou non mutations somatiques spécifiques, de l'expression ou non de protéine particulière à la surface des cellules cancéreuses comme PD-L1, et de données relatives à l'état de santé du patient (Voir Annexes 1 à 5, pages 192-194).

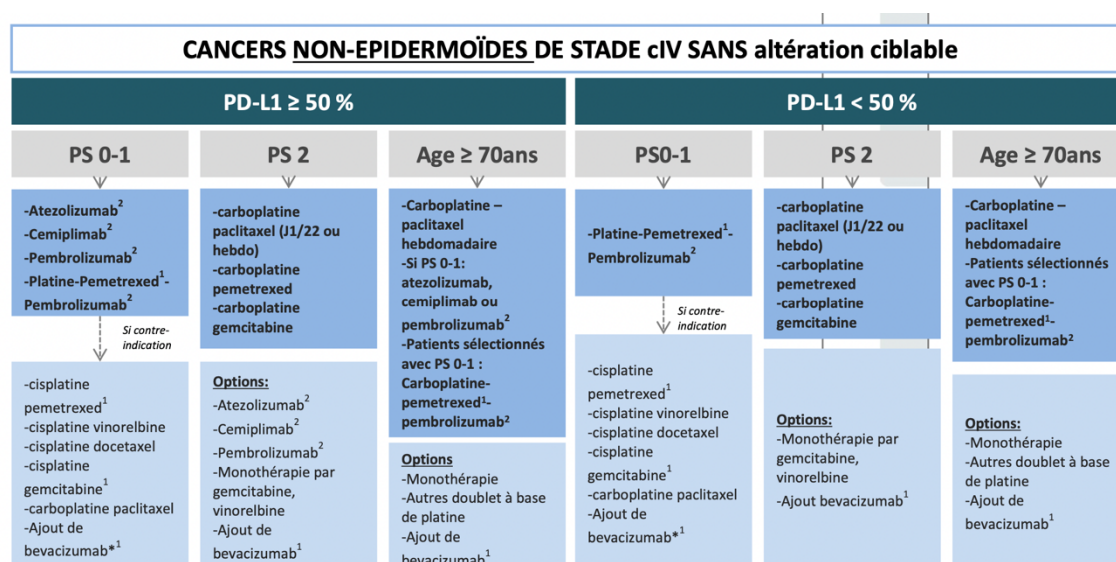


Tableau 2 : Arbre décisionnel des CBNPCs de stade IV sans altération ciblable, d'après Couraud *et al.*, Référentiels Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique, 2024.

Cependant, malgré toutes les avancées, les immunothérapies et les thérapies ciblées ne concernent qu'un nombre restreint de patients (20 à 40%) et présentent des effets limités dans certains sous type de CBNPCs (Sathish *et al.*, 2024). Les traitements locaux tel que la chirurgie et la radiothérapie ne sont possibles qu'à des stades précoces de la maladie et concernent une faible proportion des patients atteints de CBNPCs (20-25% des tumeurs sont résécables). De plus, ils ne suffisent pas à éviter les rechutes ou le développement de métastases. C'est pourquoi, tous ces traitements sont le plus souvent donnés en association avec des traitements à visés systémiques. De plus, la majorité des CBNPCs sont diagnostiqués à des stades localement avancés ou métastatiques, ce qui rend ces traitements impossibles.

La chimiothérapie à base de sels de platine tel que le cisplatine demeure le « gold standard » et un des traitements de référence, dans la prise en charge des CBNPCs et ceci quel que soit le stade (exemple de l'arbre décisionnel pour les stades IV de CBNPC sans altération ciblable, Tableau 2) ou la nature histologique.

III. Le cisplatine.

Les chimiothérapies à base de sels de platine, tel que le cisplatine, restent un des traitements de référence dans la prise en charge des CBNPCs (Rossi et Di Maio., 2016).

1) Généralités :

Originellement connu sous le nom de sel de Peyrone, le cisplatine ou le cis-diaminedichloroplatine (II) ou CDDP a été synthétisé pour la première fois en 1844 par le chimiste Michele Peyrone (Peyrone, 1845 ; Fennell *et al.*, 2016). Cependant, ses propriétés antiprolifératives n'ont été découvertes de manières accidentelles que 120 ans plus tard, en 1965, par Barnett Rosenberg sur des cultures bactériennes d'*Escherichia Coli* et quelques années plus tard sur des tumeurs solides (Rosenberg, Vancamp et Krigas., 1965 ; Rosenberg *et al.*, 1969). Ces effets antitumoraux seront confirmés dans les années 1970, dans les cancers du testicule, des ovaires et dans les CBNPCs (Fennell *et al.*, 2016). Il sera le premier composé dérivé du platine à être approuvé par la FDA, en 1978, pour ses propriétés anti-cancéreuses (Dasari et Tchounwou., 2014). A l'heure actuelle, malgré l'existence de nouvelles thérapies puissantes, la chimiothérapie cytotoxique à base de cisplatine demeure le traitement de référence dans la prise en charge des tumeurs solides, et sera prescrite à plus de la moitié des patients atteints d'un cancer (Dasari et Tchounwou., 2014 ; Rossi et Di Maio., 2016).

Le cisplatine est un agent anti-cancéreux de la classe des alkylants, très puissant et présentant une très grande réactivité chimique. En dépit de son efficacité avérée, il est également connu pour ses nombreux effets secondaires (neurotoxicité, néphrotoxicité, ototoxicité...) et pour induire de la résistance. Afin de limiter cette grande réactivité, sa toxicité et les phénomènes de résistances, des dérivés du cisplatine ont été synthétisés. Deux ont été approuvés pour leurs propriétés anti-cancéreuses, par la FDA et ont fait l'objet d'essais cliniques : le carboplatine en 1989 et l'oxaliplatine en 1994 (Rossi et Di Maio., 2016 ; Ciarimboli., 2012) (Figure 6B et C).

2) Structure :

Le cisplatine est un composé métallique à géométrie plane carrée. Il se compose d'un atome de platine en position centrale, lié à 2 groupements chlorure et 2 groupements amine (Figure 6A). Les liaisons covalentes entre le platine et l'azote des groupements amine sont pratiquement irréversibles, mais les liaisons entre le platine et les groupements chlorure sont faibles en milieu aqueux et à certains pH. Il se présente sous forme d'une poudre cristalline blanche ou jaune foncée à jaune-orange à

température ambiante. Il est généralement soluble dans l'eau (Dasari et Tchounwou., 2014 ; Lugones *et al.*, 2022).

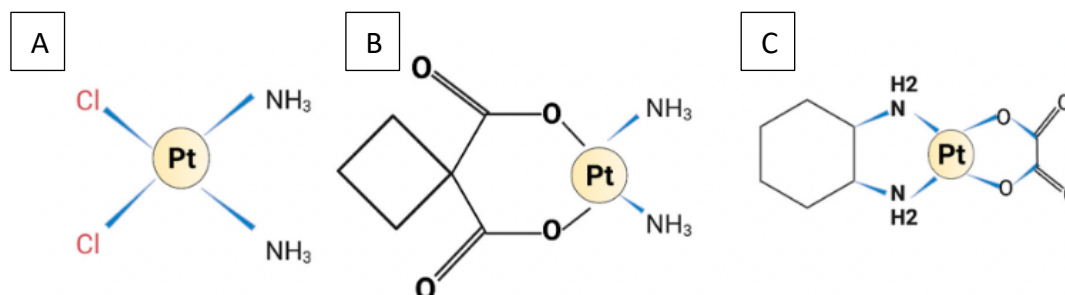


Figure 6 : Structures chimiques des principaux dérivés du platine. A) Le cisplatine, B) Le carboplatine et C) L'oxaliplatine (D'après Ali *et al.*, 2022).

3) Prise en charge par la cellule :

Le cisplatine est administré par voie intraveineuse, sous forme d'une solution saline stérile. La concentration élevée en ions chlorure dans la circulation sanguine [105 mM] permet de maintenir le cisplatine sous forme inactive (Petrović et Todorović., 2016). Dans le sang, 68 à 98% du cisplatine se lie aux protéines du plasma sanguin, en particulier à l'albumine sérique humaine. Une molécule d'albumine sérique humaine peut fixer jusqu'à 5 molécules de cisplatine, ce qui contribue également à son inactivation (Makovec., 2019). La fraction libre de cisplatine entre dans la cellule pour y effectuer son action cytotoxique (Rancoule *et al.*, 2017). L'entrée dans la cellule du cisplatine est un processus complexe et qui n'est pas encore compris dans sa totalité (Makovec., 2019). Le cisplatine entre à l'intérieur de la cellule soit par diffusion passive, soit par diffusion facilitée, faisant intervenir des transporteurs exprimés à la membrane. Les transporteurs impliqués dans cette diffusion facilitée sont les transporteurs du cuivre : CTR1 (*SLC31A1*) et CTR2 (*SLC31A2*) (Cooper Transporter Receptor 1 et 2). Certains transporteurs de cations organiques comme OCT1 et OCT2 (Organic Cation Transporter 1 et 2) participent aussi à l'entrée du cisplatine dans la cellule (Makovec., 2019 ; Ciarimboli., 2012).

Une fois la membrane plasmique traversée et arrivé dans le cytoplasme, le cisplatine est activé par un mécanisme dit « d'aquation » ou d'hydrolyse. Ce mécanisme se produit de manière spontanée, dû à la très faible concentration en ions chlorure [4 mM] dans le cytoplasme (Fennell *et al.*, 2016). La substitution des groupements chlorure par des molécules d'eau génère un produit d'hydrolyse fortement électrophile (Figure 7) et très réactif avec des molécules nucléophiles telles que les protéines, les atomes donneurs d'azote des acides nucléiques et les molécules comportant des

groupements thiols comme le glutathion, les méthionines ou les cystéines (Galluzzi *et al.*, 2012 ; Dasari et Tchounwou., 2014 ; Lugones *et al.*, 2022). Ces différentes interactions seront responsables des effets cytotoxiques du cisplatine.

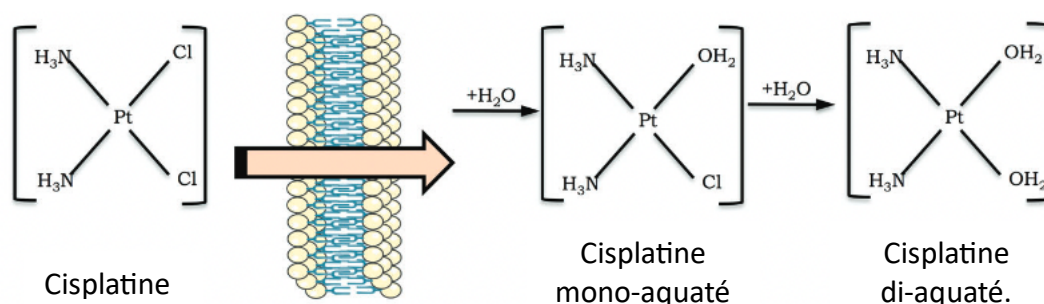


Figure 7 : Processus « d’aquation » ou d’hydrolyse du cisplatine, d’après Rocha *et al.*, 2018. Le cisplatine entre dans la cellule par diffusion passive ou facilitée et est activé par mono- ou diaquation, le rendant ainsi fortement électrophile.

4) Mode d’action du cisplatine :

Le cisplatine entre dans la cellule et agit dans le cytoplasme, sur les organites et le noyau. Il possède différents modes d’actions : la voie génotoxique ou mécanisme principal et les voies extranucléaires (réticulum endoplasmique, mitochondriale et des récepteurs de mort cellulaire).

a) *La voie génotoxique.*

Le cisplatine est un agent alkylant et sa cible principale est l’ADN nucléaire. Il se lie à l’ADN induisant des dommages à l’ADN et interfère avec les mécanismes de réparation de l’ADN. L’accumulation de cassures de l’ADN induit un arrêt du cycle cellulaire, aboutissant à la mort cellulaire programmée par apoptose (Dasari et Tchounwou., 2014).

Pour se faire, après activation, le cisplatine devient un puissant électrophile et va se lier de manière covalente avec l’azote en position 7 des bases puriques de l’ADN (adénine, guanine), formant des adduits principalement intra- ou inter- brins (Lugones *et al.*, 2022). Des adduits intermoléculaires entre l’ADN et des protéines sont également possibles (Xu et Gewirtz., 2022). La grande majorité des adduits générés seront de types intrabrins (80-90%) : 65% sont de type Guanine-Platine-Guanine et 25% sont de types Adénine-platine-Guanine (Figure 8). Les adduits intrabrins, sont considérés comme les plus cytotoxiques. Les adduits interbrins sont moins fréquents (environ 5%) (Petrović et Todorović, 2016 ; Rocha *et al.*, 2018).

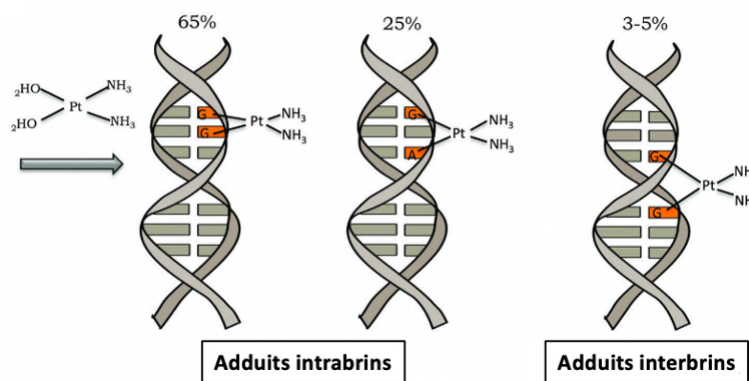


Figure 8 : Les différents types d'adduits générés par le cisplatine et leur proportion (d'après Rocha *et al.*, 2018).

Ces lésions induisent la distorsion et le déroulement de la double hélice d'ADN, aboutissant à la formation de dommages simples ou doubles brins, suivant le type d'adduits. Lorsque l'étendue des dommages est limitée, les adduits peuvent être reconnus et réparés. En effet, les adduits induisent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M. Cet arrêt facilite le recrutement et le fonctionnement de systèmes de réparation de l'ADN et prévient des mitoses potentiellement avortées ou anormales. Le cisplatine induit généralement un arrêt en phase G2 par phosphorylation des kinases Chk1 et Chk2 (Checkpoint Kinase 1 et 2) et activation de Cdc25c. Les systèmes de réparations mis en jeu sont le plus souvent la voie NER (Nucleotide Excision Repair), après activation de trois kinases que sont ATR (ATM- and Rad3related protein), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated Protein) et DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase), et la voie MMR (Mismatch Repair). La voie NER serait la voie la plus importante dans l'élimination des adduits générés par le cisplatine. Lorsque l'étendue des dommages dépasse un certain seuil critique, deux issues sont possibles : l'entrée en sénescence, un état au cours duquel la cellule ne se divise plus suite à un stress génotoxique mais ne meurt pas, ou alors la mort cellulaire programmée par apoptose (Petrović et Todorović., 2016 ; Galluzzi *et al.*, 2012). L'accumulation des dommages à l'ADN induit l'activation de la protéine suppresseur de tumeur p53, gardienne de l'intégrité du génome. Son activation dépend de l'activation de 2 kinases impliquées dans l'activation des points de contrôle : ATM et ATR. Le cisplatine active préférentiellement ATR. Une fois activées, ces kinases vont phosphoryler et activer p53, de sorte à induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Siddik., 2003).

Le cisplatine génère des ROS, tel que des radicaux libres hydroxyles et des anions super-oxydes, quand il entre dans la cellule. Ces ROS sont connus pour induire des dommages à l'ADN, renforçant ainsi l'effet génotoxique du cisplatine (Figure 9) (Petrović et Todorović., 2016).

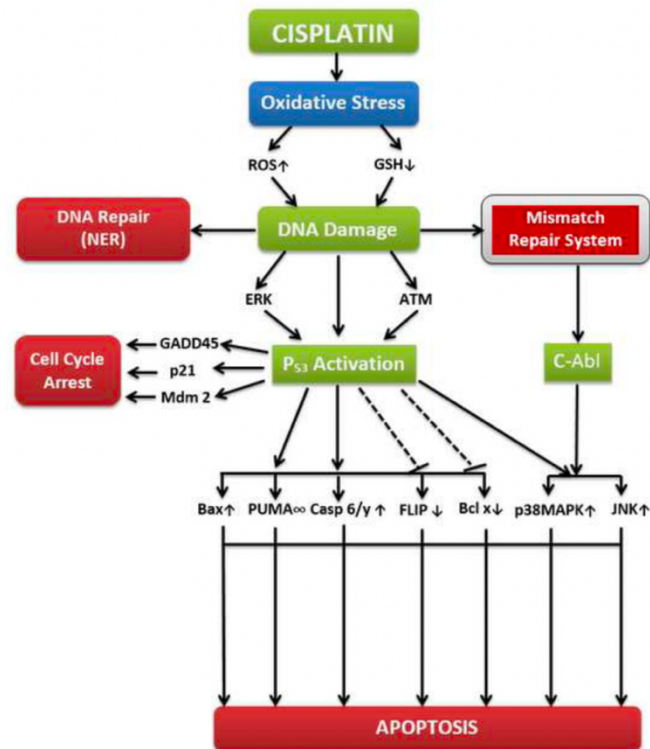


Figure 9 : Mode d'action principale du cisplatine : la voie génotoxique, d'après Dasari et Tchounwou., 2016.

Aujourd'hui, il est largement reconnu que les effets cytotoxiques du cisplatine ne passent pas uniquement par la voie génotoxique. En effet, ses effets cytotoxiques font intervenir d'autres voies cytoplasmiques (Figure 11).

b) Les voies extranucléaires.

i) La voie mitochondriale.

Des études montrent que seule une faible quantité du cisplatine interagit avec l'ADN nucléaire, tandis que la grande majorité va interagir avec des protéines et l'ADN mitochondrial (Siddik., 2003). L'ADN mitochondrial étant plus sensible aux dommages que l'ADN nucléaire, en raison de la capacité limitée de réparation de l'ADN mitochondrial, le cisplatine va y former préférentiellement des adduits. Dû à l'échec du processus de réparation de l'ADN mitochondrial, l'apoptose est enclenchée, ce qui entraîne l'activation des caspases 3 et 7 (Petrović et Todorović., 2016 ; Huang *et al.*, 2022).

De plus en entrant dans le cytoplasme, le cisplatine génère des ROS à l'origine d'un stress oxydatif. Bien que la cellule dispose de mécanismes de compensation de ces ROS tel que le glutathion réduit (GSH : γ -glutamylcysteinyl glycine) et la superoxyde dismutase (SOD), le cisplatine de par son aspect fortement électrophile va épuiser ces équivalents réduits car ils sont extrêmement nucléophiles, renforçant ainsi le stress oxydatif (Galluzzi *et al.*, 2012). Ces ROS peuvent renforcer les dommages à

l'ADN mitochondrial et vont également entraîner la perte des groupements sulfhydryles ou thiols des protéines mitochondriales et induire l'absorption du calcium intra-cellulaire par la mitochondrie. Cela a pour conséquences de diminuer le potentiel de membrane et d'aboutir à la rupture des mitochondries, enclenchant l'apoptose (Petrović et Todorović., 2016 ; Huang *et al.*, 2022). La production importante de ROS par le cisplatine, induit la translocation à la membrane mitochondriale externe de protéines pro-apoptotiques, telles que Bax (Bcl2 associated protein) et Bak (Bcl2-homologous antagonist killer). Ceci aboutit à la perméabilisation membranaire et à la libération du cytochrome c, suivi de la formation du complexe apoptosomal, permettant l'activation de la caspase 9 et des autres caspases par celle-ci (Galluzzi et al., 2012 ; Huang *et al.*, 2022).

ii) La voie du réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle important dans la synthèse, la transformation, le repliement et la dégradation des protéines. Le cisplatine affecte la signalisation intra-cellulaire en bloquant des transporteurs du calcium exprimé au niveau du RE. Ce blocage est responsable de l'augmentation du calcium intracellulaire, puisque celui-ci ne peut plus s'accumuler dans le RE, ce qui provoque l'activation de la caspase 12 et des lysosomes. Ce mécanisme est connu pour induire la dégradation des protéines mal repliées et renforce ainsi le stress du RE. Le stress du RE induit l'activation des caspases 12 et 9, suivi de l'activation des autres caspases (Caspases 3, 6 et 7) menant à l'apoptose (Mandic *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2022).

iii) Les autres cibles extranucléaires du cisplatine.

- Des études montrent que les pompes échangeuses de Na^+/H^+ liées à la membrane sont une des cibles du cisplatine. En se liant à ces pompes dans les cellules cancéreuses, le milieu intracellulaire s'acidifie, les membranes vont se fluidifier par la promotion de radeaux lipidiques et induire l'apoptose par activation de la voie des récepteurs de mort, aboutissant à la mort cellulaire (Hellberg *et al.*, 2009).

- Le cisplatine peut interagir avec des facteurs de transcription afin de réguler l'expression de gènes. Le cisplatine va progressivement interagir avec l'ion zinc des facteurs de transcription, de sorte à le remplacer. La structure en doigt de zinc des facteurs de transcription est alors modifiée, entraînant un blocage de la réplication de l'ADN par les ADN polymérases et produisant la mort cellulaire (Makovec., 2019).

- Le cisplatine peut perturber le cytosquelette, en ciblant la tubuline, unité fondamentale dans l'assemblage/désassemblage des microtubules au cours de la mitose. Le cisplatine bloque le désassemblage de la tubuline des microtubules en se fixant à la guanine du GTP (Guanosine Triphosphate) nécessaire à la formation des filaments (Makovec, 2019).

- Enfin, l'ARN est une autre cible du cisplatine, qui a longtemps été négligée. Pourtant, des études ont montré que le cisplatine se lie 4 à 20 fois plus à l'ARN qu'à l'ADN, générant des cassures (Hostteter, Osborn et DeRose., 2012).

c) Mort cellulaire induite par le cisplatine.

La mort cellulaire induite par le cisplatine fait intervenir 2 voies : la voie intrinsèque *via* la mitochondrie et la voie extrinsèque *via* des récepteurs de mort cellulaire (Figure 10) (Xu *et al.*, 2022).

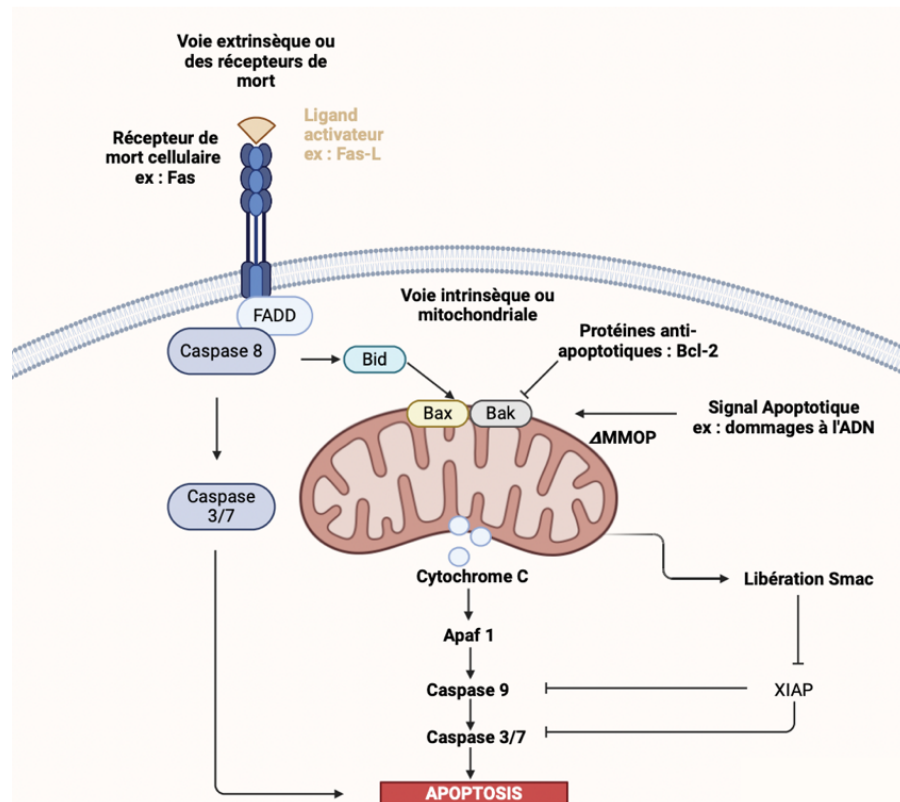


Figure 10 : Les voies de signalisation de l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, d'après Bock et Tait., 2020. FADD : Fas Associated protein with Death Domain ; FAS : Fas cell Surface Death Receptor ; Fas-L : Fac cell surface Death Receptor Ligand ; BID : BH3 interacting- domain death agoniste ; BCL-2 : B-cell lymphoma 2 protein ; Bax : Bcl2- associated X protein ; Bak : Bcl2- homologous killer ; MOMP : perméabilisation de la membrane externe mitochondriale ; Apaf 1 : Apoptotic peptidase 1 ; Smac : Second mitochondria-derived activator of caspase.

i) La voie des récepteurs de mort.

Connue aussi sous le nom de voie extrinsèque, son activation provient de stimuli extérieurs à la cellule. Les ROS générés par le cisplatine induisent l'activation de récepteurs de la famille des récepteurs au facteur de nécrose tumoral (TNF), dont Fas et récepteur au $\text{TNF}\alpha$ sont membres. L'activation *via* le cisplatine induit la fixation de leur ligand respectifs (FasL et $\text{TNF}\alpha$), et l'activation des domaines de mort associés. Ceci permet le recrutement et l'activation de la caspase 8. Ce complexe apoptotique active, à son tour, les caspases 3 et 7 par clivage, rendant l'apoptose inévitable (Figure 11) (Gupta *et al.*, 2012).

ii) La voie mitochondriale.

La voie intrinsèque, induite par le cisplatine, repose sur le stress oxydatif et les ROS générés par le cisplatine intracellulaire. Il est vrai que les cellules traitées au cisplatine accumulent un nombre excessif de ROS. Le processus est initié par l'inhibition de protéines Bcl-2 anti-apoptotiques et permet l'activation de protéines pro-apoptotique effectrices comme Bax et Bak, induisant leur migration vers la membrane externe des mitochondries (Kroemer, Galluzzi et Brenner, 2007 ; Bock et Tait., 2020). Cette perméabilisation permet la libération de protéines intermembranaires tel que le cytochrome c. Après libération, le cytochrome c se lie au facteur d'activation des peptidases apoptotiques 1 (Apaf-1), formant l'apoptosome ou complexe apoptosomal. Cette structure recrute et active la caspase 9, qui à son tour clive les caspases 3 et 7 aboutissant à la mort cellulaire par apoptose (Bock et Tait., 2020).

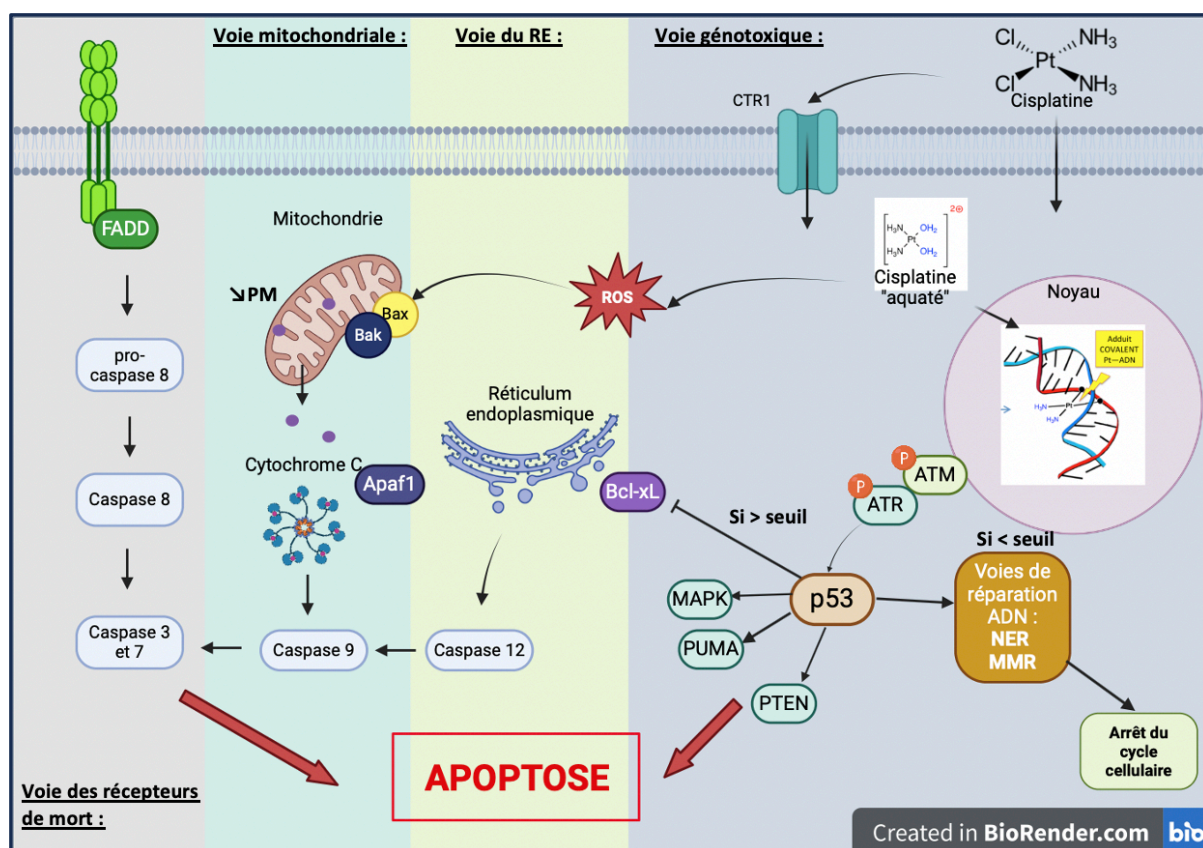


Figure 11 : Schéma récapitulatif des modes d'actions du cisplatine d'après Dasari et Tchounwou., 2016 ; Bock et Tait., 2020 ; Gupta *et al.*, 2012 ; Huang *et al.*, 2022. FADD : Fas Associated Death Domain ; Apaf1 : Apoptotic peptidase 1 ; Bax : Bcl2- associated X protein ; Bak : Bcl2- homologous killer ; ROS : Reative Oxygen Species ; Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra-large ; ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated ; ATR : ATM and Rad3-related ; PUMA : p53 regulated mediator apoptosis ; PTEN : Phosphatase and TENSin homolog.

5) Les mécanismes associés à la résistance au cisplatine :

Bien que ses effets antinéoplasiques soient largement reconnus et que les chimiothérapies à base de cisplatine restent le « gold standard » dans la prise en charge des CBNPCs, le cisplatine possède des limites à son utilisation (Fennell *et al.*, 2016). 50% des patients traités avec du cisplatine vont développer une résistance intrinsèque ou une résistance multidrogues rapidement. La résistance au cisplatine est un phénomène multifactoriel, dont certains des mécanismes associés peuvent coexister au sein de la cellule. Ces facteurs responsables de la chimiorésistance peuvent être classés en facteurs (i) « pré-target », (ii) « on-target », (iii) « post-target » et (iv) « off target » (Siddik *et al.*, 2003 ; Lugones *et al.*, 2022).

a) Facteurs « pré-target » ou en amont de la cible.

La résistance au cisplatine repose sur la mise en place de mécanismes en amont de sa cible. Dans ce cas, la résistance au cisplatine se développe par une diminution de l'accumulation du cisplatine intracellulaire (*via* l'influx et l'efflux de la drogue) ou *via* une augmentation de la séquestration de la forme active du cisplatine (Figure 12) (Galluzzi *et al.*, 2012).

i) Diminution de l'accumulation intracellulaire du cisplatine.

La première barrière à l'accumulation intracellulaire du cisplatine est le microenvironnement tumoral entourant la tumeur. Il se compose de cellules cancéreuses mais aussi de cellules normales non malignes et de cellules immunitaires. Cette accumulation de cellules forme une barrière physique composée d'une matrice extracellulaire dense, qui limite considérablement le taux de diffusion des médicaments anti-cancéreux (Kryczka *et al.*, 2021).

Bien qu'on ait longtemps pensé que le cisplatine entrait uniquement dans la cellule par diffusion passive, il est maintenant admis que son entrée dans la cellule se fait principalement par l'intermédiaire de transporteurs médiant une diffusion facilitée, tel que CTR1 et 2 (Makovec, 2019). Parmi les transporteurs impliqués dans la résistance, CTR1 se distingue (Ali *et al.*, 2022). En effet, CTR1 (codé par le gène *SLC31A1*) est un transporteur de haute affinité du cuivre, exprimé de manière ubiquitaire. Le cisplatine en interagissant avec CTR1 provoque des changements dans sa conformation, conduisant à son influx. Mais cette interaction peut conduire à l'internalisation puis à la dégradation du transporteur, diminuant ainsi l'absorption du cisplatine et son accumulation intracellulaire (Holzer et Howell., 2006 ; Kilari *et al.*, 2016).

La diminution d'accumulation intracellulaire du cisplatine peut faire intervenir des transporteurs à efflux. ATP7A et ATP7B (Cooper-transporting P-type ATPase A and B) qui participent à l'homéostasie du cuivre en facilitant son efflux après hydrolyse de l'ATP, sont 2 acteurs non négligeables de cette diminution d'accumulation du cisplatine. En effet, ils sont connus pour participer à l'efflux des dérivés du platine, tel que le cisplatine (Sprowl *et al.*, 2013). D'autres études soutiennent ce rôle en montrant qu'ils sont sur-exprimés dans des cellules résistantes au cisplatine (Safaei *et al.*, 2004).

D'autres transporteurs à efflux interviennent dans la diminution de l'accumulation intracellulaire du cisplatine. Parmi ces transporteurs, les membres de la famille ABC (ATP Binding

Cassette) sont largement connus pour jouer un rôle dans la chimioprotection, notamment grâce à leur capacité d'exporter un large spectre de médicaments hors de la cellule (Ali *et al.*, 2022). Les ABCC (ou MRP pour Multidrug Resistance Protein) induisent la résistance au cisplatine en augmentant l'efflux (Galluzzi *et al.*, 2012). ABCC2 ou MRP2 est sur-exprimé dans les lignées cellulaires résistantes au cisplatine (Kool *et al.*, 1997) et permet d'exporter le complexe formé par le cisplatine et le GSH réduit hors de la cellule (Sprowl *et al.*, 2013). ABCC2 est connu comme étant un des acteurs de l'efflux du cisplatine et pourrait donc être un bon indicateur de la réponse au traitement selon différentes études (Yamasaki *et al.*, 2011 ; Sprowl *et al.*, 2013). D'autres transporteurs de cette famille induisent la résistance dont ABCC4 ou MRP4, qui est sur-exprimé dans les lignées cellulaires résistantes au cisplatine et son ciblage par un siRNA permet de diminuer la résistance au cisplatine (Zhang *et al.*, 2010).

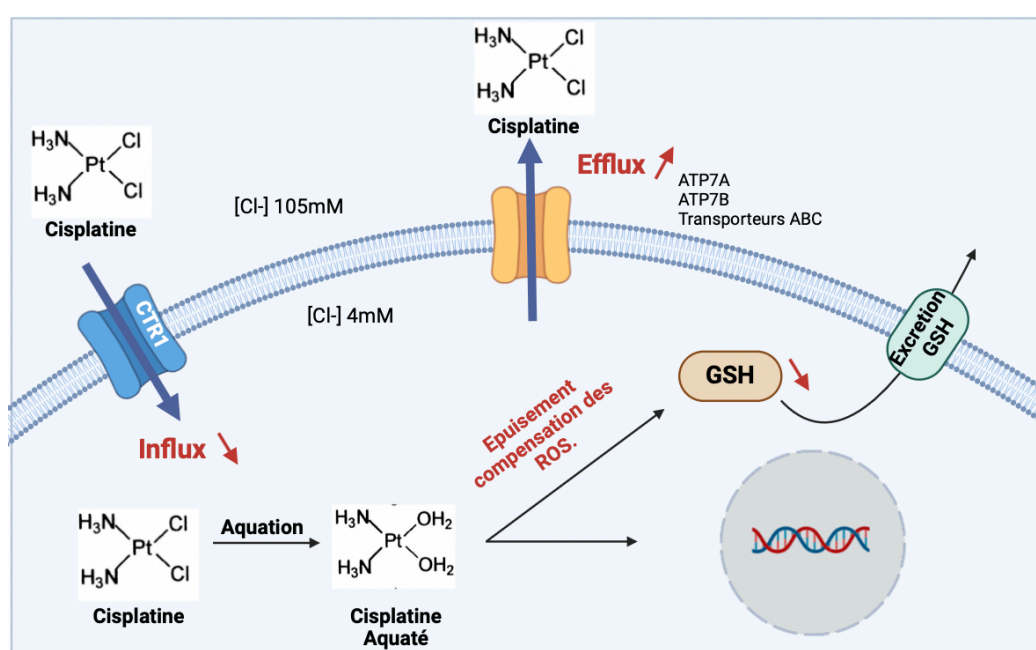


Figure 12 : Mécanismes impliqués dans la résistance « Pre-target » au cisplatine, d'après Rocha *et al.*, 2018.

CTR1 : Cooper Transporter Receptor 1 ; ATP7A et B : Cooper-transporting P-type ATPase A et B ; ABC : ATP Binding Cassette ; GSH : γ -glutamylcysteinyl glycine.

ii) Diminution de la forme active du cisplatine.

Le dernier facteur intervenant dans la résistance « pre-target » est la diminution intracellulaire de la forme active du cisplatine. Le cisplatine activé par « aquation », devient fortement électrophile et avide de substances nucléophiles, comme la GSH réduit, la méthionine, les métallothionéines et d'autres protéines riches en cystéines. Cette interaction induit une diminution du stress oxydant induit par le cisplatine, une diminution de la forme active du cisplatine et empêche son action cytotoxique et

génomotoxique du cisplatine (Galluzzi et al., 2012 ; Lugones *et al.*, 2022). Une augmentation d'expression des systèmes de détoxification intracellulaire peut également expliquer la résistance au cisplatine (Figure 12) (Rocha *et al.*, 2018).

b) Facteurs « on-target » ou résistance aux dommages à l'ADN.

La reconnaissance des adduits inter- ou intra-brins et la génération d'un signal apoptotique qui en découle, sont souvent altérés dans les cellules cancéreuses résistantes au cisplatine. En effet, les cellules résistantes au cisplatine peuvent survivre en activant des mécanismes de réparation de l'ADN ou en tolérant les dommages non réparés, grâce à des ADN polymérases particulières (Galluzzi *et al.*, 2012).

i) Activation de protéines impliquées dans la réparation des cassures simples brins.

Réparation par système NER :

La voie NER est la voie majoritairement impliquée dans la réparation de l'ADN, dans les cellules cancéreuses résistantes au cisplatine. En faisant intervenir plus de 20 protéines dans un ordre bien précis, cette voie de réparation permet d'enlever la liaison formée entre le groupement platine et l'ADN, par excision du nucléotide lésé, après incision de part et d'autre de celui-ci, suivi d'une synthèse d'ADN pour reconstituer la séquence et restaurer l'intégrité génétique (Galluzzi et al., 2012 ; Lugones *et al.*, 2022) (Figure 13).

Des dérégulations de cette voie de réparation sont connues pour être impliquées dans la résistance au cisplatine. Dans le CBNPC, une étude montre une corrélation négative entre l'expression d'ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementing group 1) et la survie et la réponse au cisplatine, *in vivo* mais aussi *in vitro* (Olaussen *et al.*, 2006). Néanmoins, une augmentation de l'expression d'ERCC1 n'est pas toujours nécessaire pour expliquer cette réparation plus accrue des dommages, car une augmentation de l'efficacité de la voie NER est également associée à la résistance au cisplatine (Rocha *et al.*, 2018 ; Ali *et al.*, 2022).

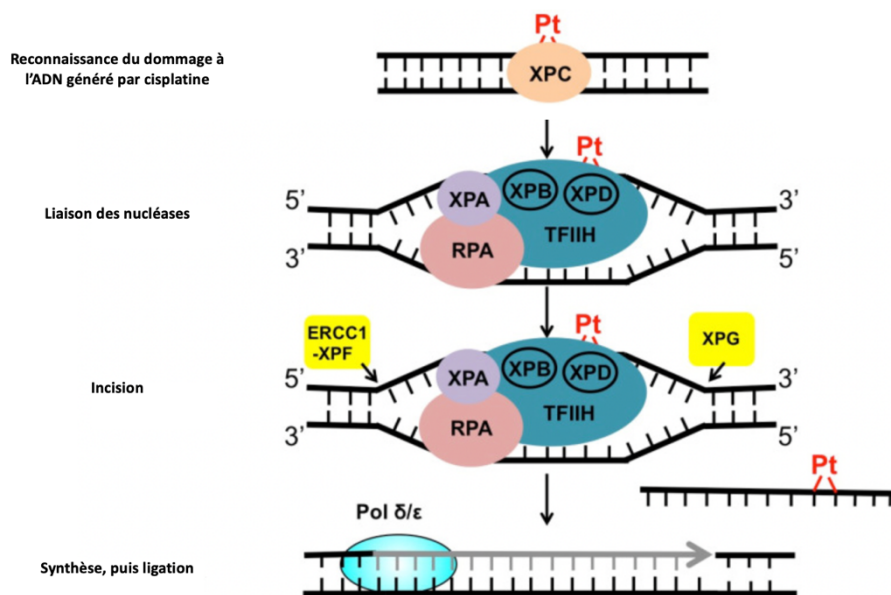


Figure 13 : Mécanisme de réparation de l'ADN par la voie NER, d'après Duan *et al.*, 2020. XPA, B, C, D, F et G : Xeroderma Pigmentosum A, B, C, D, F et G ; RPA : Replication Protein A ; TFIIH : Transcription Factor II H ; ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementing group 1 ; Pol δ/ϵ : ADN Polymerase δ/ϵ .

Réparation par système MMR :

La voie MMR est une voie impliquée dans la réparation des mésappariements de bases nucléotidiques survenant au cours de la réplication de l'ADN. Elle intervient à juste titre dans la stabilité et l'intégrité génétique. Il s'agit d'un système multi-enzymatique faisant intervenir les enzymes MSH (MutS Homologue), MLH (MutL protein homologue) et PMS 1/2 (Postmeiotic segregation increased 1/2), qui vont interagir sous forme d'hétérodimères afin de percevoir et réparer les bases mésappariées (Rocha *et al.*, 2018 ; Pečina-Šlaus *et al.*, 2020) (Figure 14).

Dans le cas des cellules résistantes au cisplatine, une augmentation de la tolérance aux dommages à l'ADN est possible, provenant d'une perte de fonction de la voie MMR. Des déficiences de la voie MMR sont retrouvés dans 17% des cancers (Rocha *et al.*, 2018). En effet, les lésions induites par le cisplatine peuvent être reconnues par la voie MMR mais pas réparés, ce qui génère un signal pro-apoptotique. Les liaisons Guanine-platine-Guanine sont reconnues par MSH2 et MLH1. Or dans les cellules cancéreuses résistantes au cisplatine, MSH2 et MLH1 sont généralement mutés ou régulés à la baisse (forte hyperméthylation du promoteur de MLH1 après un traitement cisplatine), inhibant la reconnaissance des lésions ainsi que la transmission du signal pro-apoptotique (Galluzzi *et al.*, 2012 ; Lugones *et al.*, 2022). Dans le CBNPC, il a été montré que les patients avec des hauts niveaux

d'expressions de MSH2 présentait de meilleurs taux de réponse au cisplatine et un meilleur pronostic (Kamal *et al.*, 2010).

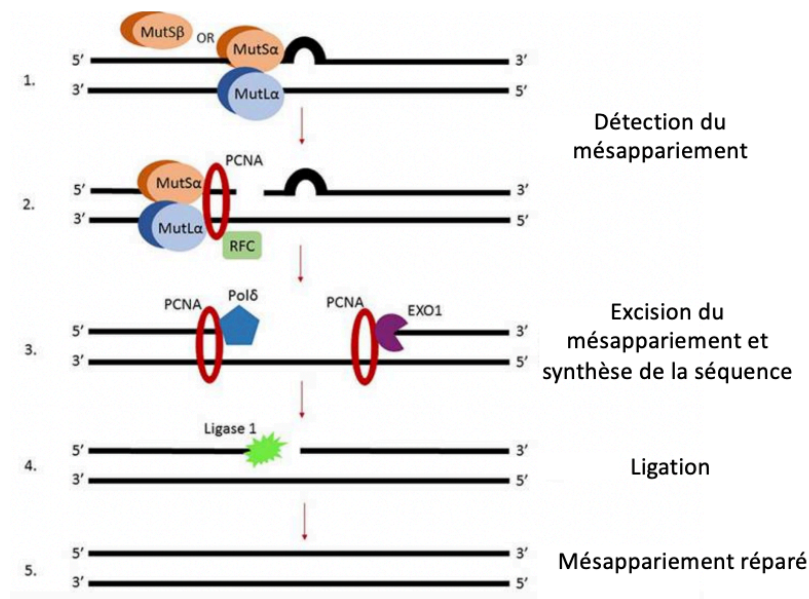


Figure 14 : Mécanisme de réparation de l'ADN *via* la voie MMR, d'après Pečina-Šlaus *et al.*, 2020. MutSβ : hétérodimère MSH2-MSH3 ; MutSα : hétérodimère MSH2-MSH6 ; PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen ; RFC : Replication Factor F ; EXO1 : Exonuclease 1 ; Polδ : ADN Polymerase δ.

ii) Mécanismes de tolérance des dommages à l'ADN simple brin.

Le cisplatine en formant des adduits intra-brins, a pour objectif d'induire l'accumulation de dommages à l'ADN irréversibles menant à un arrêt réplcatif et à la mort de la cellule *via* l'apoptose. Néanmoins, les cellules cancéreuses possèdent la machinerie nécessaire pour pallier à ce phénomène. La tolérance aux dommages à l'ADN est liée au contournement réplcatif, par certaines classes d'ADN polymérases (PolH, PolI, PolK, Rev 1,3 et 7 qui sont sur-exprimées en condition cancéreuse), des lésions induites par le cisplatine (Huang *et al.*, 2021). En effet, des défauts de MLH1 et MSH6 (composants de la voie MMR) sont associés à des niveaux accrus de « translésions », phénomènes au cours duquel la synthèse de l'ADN n'est pas bloquée, mais se poursuit malgré les adduits formés par le cisplatine. L'ADN polymérase PolH et l'hétérodimère Rev 3- Rev 7 sont impliqués dans le contournement réplcatif des adduits guanine-platine-guanine. La surexpression de Rev 3 est corrélée avec la résistance au cisplatine, tandis que l'expression de PolH est corrélée à la survie dans le cancer du poumon (Galluzzi *et al.*, 2012 ; Lugones *et al.*, 2022 ; Ali *et al.*, 2022). Autre leur rôle dans la réparation des dommages doubles brins par recombinaison homologe, BRCA1 et BRCA2 (Breast Cancer 1 et 2) protègent les fourches réplcatives bloquées en empêchant la dégradation de l'ADN en cours de synthèse (Huang *et al.*, 2021).

iii) *Activation de protéines impliquées dans la réparation des cassures doubles brins.*

Le cisplatine induit des adduits intercaténaux qui sont normalement réparés par recombinaison homologue (HR) en phase S. La signalisation de la cassure double brins est initiée par le recrutement du complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) aux extrémités cassées. Ce complexe joue un rôle fondamental dans le recrutement et l'activation des protéines kinases ATM et ATR. Ces kinases vont alors coordonner l'activation de protéines effectrices de la voie de réponse aux dommages à l'ADN, dont l'activation et la stabilisation de la protéine p53. L'activation de p53 induit une augmentation d'expression de protéines inhibitrices du cycle cellulaire tel que p21, Chk1 et 2. Cet arrêt du cycle cellulaire laisse alors le temps aux mécanismes de réparation de l'ADN de réparer les dommages générés par le cisplatine, sans induire la mort de celle-ci (Figure 15) (Huang *et al.*, 2021).

L'activation de ATM ou ATR sera également responsable de la voie de réparation des dommages à l'ADN par NHEJ (Non Homologous End Joining) ou HR, par recrutement de différentes protéines dont BRCA1 et BRCA2 et DNA-PK (Sun *et al.*, 2020). BRCA1 et 2 sont les protéines fondamentales de la voie de réparation homologue, qui sont fréquemment mutées, ce qui affecte donc les mécanismes de réparation des cassures doubles brins (Galluzzi *et al.*, 2021). BRCA1 est connue pour médier la résistance au cisplatine et notamment dans les CBNPCs. L'augmentation de l'efficacité de la voie HR favorise la réparation des dommages interbrins et est associée à l'acquisition de la résistance au cisplatine (Fennell *et al.*, 2016).

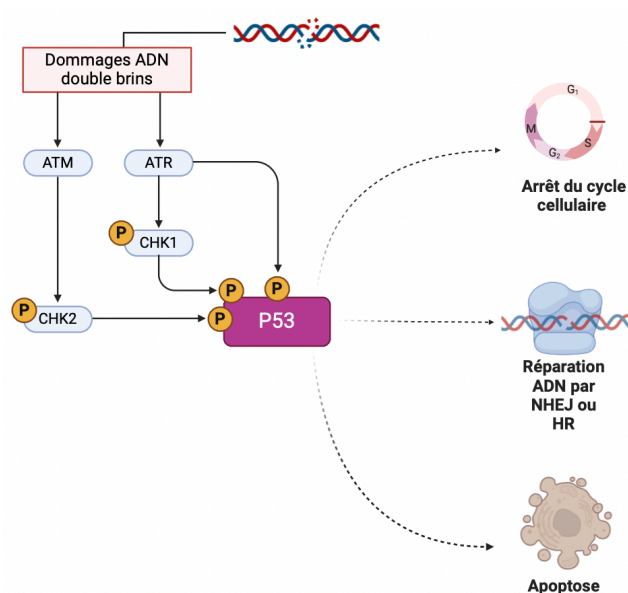


Figure 15 : Mécanismes de réparation des dommages à l'ADN double brins, d'après Huang *et al.*, 2021. ATM : Ataxia Telangiectasia mutated ; ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein ; CHK1/CHK2 : Checkpoint Kinase 1 et 2.

c) Les facteurs « post-target » ou altérations des voies de signalisation.

La résistance au cisplatine peut résulter d'un défaut de signalisation dans les voies conduisant à la mort cellulaire, normalement induite par les dommages à l'ADN. L'altération de ces voies de transduction repose sur des altérations génétiques et épigénétiques (Galluzzi *et al.*, 2012).

Le principal mécanisme « post-target » repose sur l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *TP53*, qui est retrouvée dans plus de 50% des cancers. En condition normale, quand les dommages n'excèdent pas un certain seuil, la protéine p53 induit un arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation des dommages à l'ADN. En revanche, lorsque l'accumulation des dommages est trop importante, p53 intervient dans l'initiation du processus de mort cellulaire par apoptose. Cette inactivation du gène *TP53*, induit une diminution de l'expression de p53, protéine gardienne du génome. La diminution d'expression de p53 empêche l'activation de Bax et induit l'inactivation des caspases 3, 8 et 9, inhibant le déclenchement du processus apoptotique (Figure 16) (Lugones *et al.*, 2022).

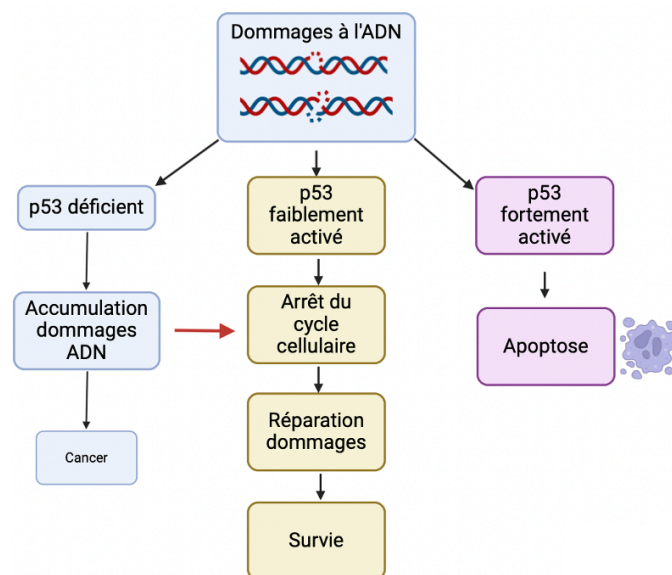


Figure 16 : Le devenir de la cellule dépend du niveau d'activation de p53, d'après Lugones *et al.*, 2022.

Des études pré-cliniques suggèrent que d'autres transducteurs de signaux pro-apoptotiques jouent un rôle. Parmi ces transducteurs, on peut citer la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Il a été proposé que certaines cellules résistantes au cisplatine, ne présentaient pas d'activation de MAPK1 et de c-JUN. Ceci limiterait donc la signalisation par le système Fas/FasL, conférant la cytoprotection face au cisplatine (Lugones *et al.*, 2022).

Dans le CBNPC, il a été rapporté que la résistance au cisplatine était corrélée à une augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, Bcl-xl (Han *et al.*, 2003). Une augmentation d'expression de la survivine, une protéine inhibitrice de caspases, est un autre moyen d'expliquer la résistance au cisplatine dans le CBNPC (Karczmarek-Borowska., 2005).

d) Les facteurs « off-target ».

La résistance au cisplatine résulte de l'altération de voies de signalisation qui ne sont pas directement en lien avec le cisplatine, mais qui peuvent interférer avec les événements pro-apoptotiques induit par celui-ci (Lugones *et al.*, 2022).

i) La surexpression de proto-oncogène.

La surexpression du proto-oncogène *ErbB2* codant pour HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) est une explication de la résistance au cisplatine. En effet, HER2 joue un rôle fondamental dans l'activation de diverses voies de signalisation, qui régulent la survie cellulaire, la croissance et la différenciation cellulaire. Parmi les voies activées en aval de ce récepteur, la voie PI3K/AKT est particulièrement intéressante, car son activation induit l'expression de p21 (un inhibiteur de cycline). L'arrêt du cycle cellulaire induit par l'accumulation de p21 exerce des fonctions anti-apoptotiques, laissant le temps aux systèmes de réparation de l'ADN de réparer les dommages induit par le cisplatine. Les cellules ainsi réparées, reprennent leur division. Dans le CBNPC, la surexpression d'*ErbB2* est associée à la résistance au cisplatine (Galluzzi *et al.*, 2012).

ii) La détoxification intracellulaire.

Dans de nombreuses tumeurs solides, y compris les CBNPCs, *DYRK1B* (Dual-specificity Y-phosphorylation Regulated Kinase 1B) est régulé à la hausse et facilite la survie en induisant l'expression de systèmes anti-oxydants (ferroxydase, superoxyde dismutase 2 et 3). Ces systèmes vont alors compenser les ROS induits par le cisplatine et mener à la résistance (Galluzzi *et al.*, 2012 ; Lugones *et al.*, 2022). Les cellules résistantes au cisplatine présentent la capacité de produire plus de GSH et de NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen), des molécules antioxydantes facilement utilisées par plusieurs enzymes impliquées dans la compensation des ROS, telles que les SOD, les catalases et les glutathions peroxydases (*GPX3*, *GPX4*) (Huang *et al.*, 2021).

iii) *Acquisition du phénotype « cellule souche cancéreuse ».*

D'autres mécanismes sont connus pour être impliqués dans la résistance au cisplatine. En effet, des études montrent que la résistance au cisplatine peut être médiée par des facteurs épigénétiques, qui modulent l'expression de gènes importants dans la réponse au cisplatine.

Il a été montré que ces facteurs favorisent l'expression de gènes impliqués dans l'acquisition d'un phénotype qualifié de « cellule souche cancéreuse » (CSC), état au cours duquel les cellules vont acquérir la pluripotence, impliqué dans la résistance, la rechute et la dissémination de la maladie. A titre d'exemple, dans le CBNPC, la transcription de *FOXF1* (Forkhead box F1) est favorisée par déméthylation de sa région régulatrice. Ainsi *FOXF1* favorise l'acquisition du phénotype cellule souche cancéreuse et participe à la résistance au cisplatine. De même, une régulation positive de l'expression de *SOX2* (SRY-Box Transcription Factor 2) est impliquée dans l'acquisition de ce phénotype (Lugones *et al.*, 2022).

iv) *L'autophagie.*

L'autophagie est une voie catabolique conservée au cours de l'évolution. Elle aide à la dégradation et au recyclage des macromolécules biologiques nocives ou non (protéines mal repliées/ conformées/ endommagées, organites endommagés) essentielles aux cellules, leurs permettant de s'adapter au stress et aux changements dans les environnements intra- et extra-cellulaire (Wang *et al.*, 2022). Les protéines et organites cellulaires endommagés sont engloutis par des autophagosomes, qui par la suite fusionnent avec des lysosomes. Les lysosomes sont des petits organites contenant de nombreuses enzymes comme des protéases et des lipases. Après fusion avec l'autophagosome, les enzymes lysosomales vont dégrader son contenu, afin de permettre le recyclage des matériaux (acides aminés, acides gras) (Wang *et al.*, 2022 ; Circu *et al.*, 2017) (Figure 17). Cette voie catabolique pourrait être un mécanisme associé à la résistance au cisplatine (Xu et Gewirtz., 2022).

Dans le CBNPC, une étude montre une augmentation progressive de la chimiorésistance au cisplatine lorsque les composants de la voie autophagique sont régulés à la hausse (Ren *et al.*, 2010). De plus, des études récentes montrent des mutations dérégulatrices dans les gènes d'ATG5, 7, 12 et 14 (Autophagy related protein 5, 7, 12 and 14), protéines clés de la formation des autophagosomes et donc de la régulation autophagique (Pan, Zhang et Dokudovskaya., 2023).

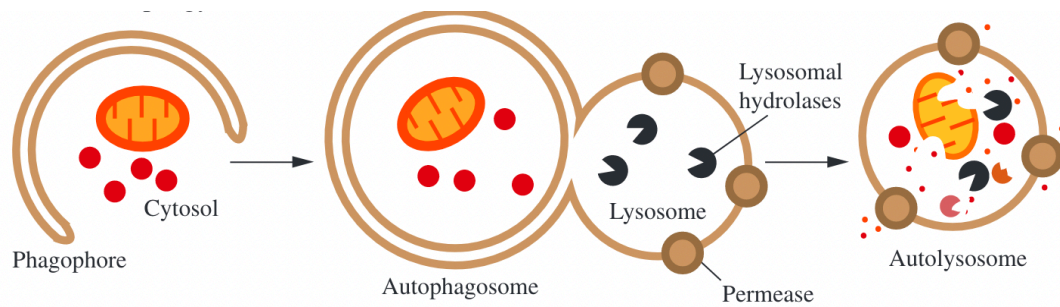


Figure 17 : Dégradation d'organites ou protéines endommagées *via* la voie autophagique. Le mécanisme autophagique se divise en plusieurs étapes dont 1) l'initiation qui correspond à l'étape de formation des membranes d'isolement des matériaux à dégrader, 2) la nucléation ou expansion des membranes de l'autophagosome conduisant à sa fermeture et l'isolement de sa cargaison, 3) la fusion entre l'autophagosome et le lysosome 4) la dégradation du contenu par les enzymes lysosomales, d'après Parzych et Klionsky., 2014.

v) *Le microenvironnement immunitaire tumoral.*

Le microenvironnement tumoral se compose de différents types de cellules : de cellules tumorales, de cellules normales non malignes mais aussi de cellules immunitaires avec différents phénotypes et fonctions, qui peuvent moduler la réponse à la chimiothérapie. C'est le cas des macrophages associés à la tumeur (TAM). Les macrophages possèdent la capacité de se différencier en type M2 ou alternatif. En acquérant, le phénotype M2, ils entraînent la libération de TGF- β (Transforming Growth Factor- β), qui déclenche la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un processus important dans l'acquisition de la résistance au cisplatine. Au cours de ce processus, les cellules épithéliales immobiles et proliférantes sont converties en cellules mésenchymateuses mobiles et moins prolifératives, donc plus résistante au cisplatine (Kryczka *et al.*, 2021).

En conclusion, la résistance au cisplatine est multifactorielle et résulte de l'association de ces différents mécanismes : pré-target, on target, off-target et post-target (Figure 18). Cette résistance est un véritable frein pour la prise en charge des patients atteints de CBNPCs, car elle est responsable de l'échec thérapeutique et de l'évolution de la maladie. C'est pourquoi, il est important d'étudier en profondeur les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la résistance, afin de permettre une meilleure prise en charge des patients.

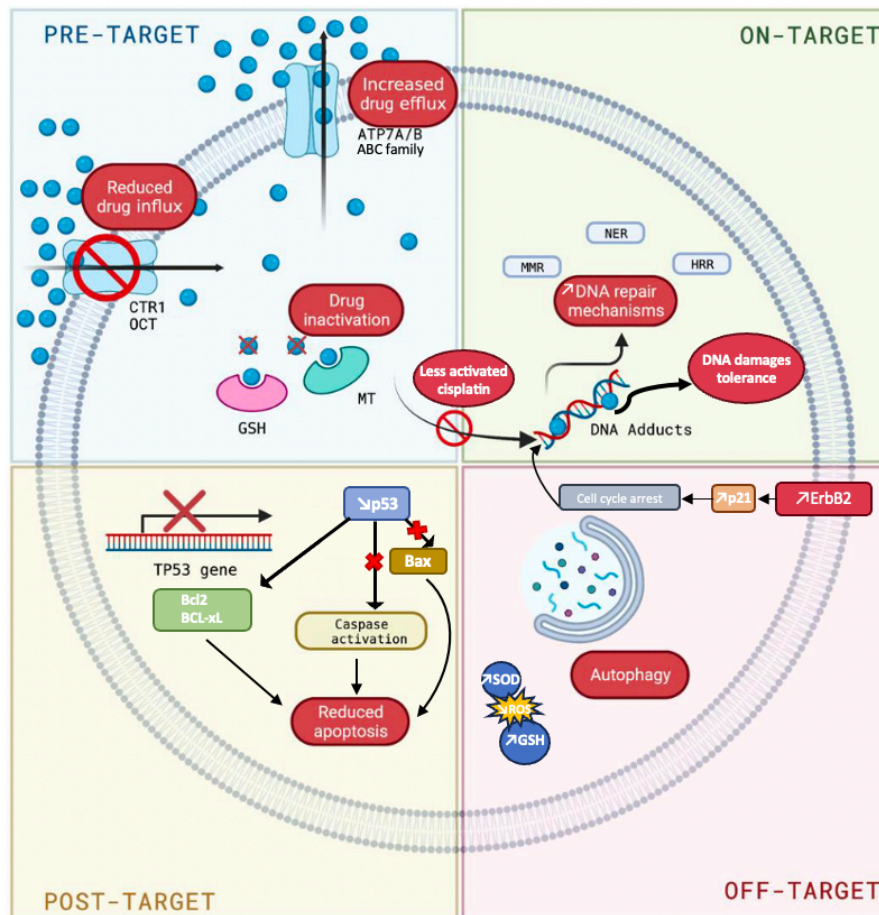


Figure 18 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des mécanismes impliqués dans la résistance au cisplatine, d'après Lugones *et al.*, 2022. CTR1 : Cooper Transporter Receptor 1 ; OCT : Organic Cation Transporter ; GSH : γ -glutamylcysteinyl glycine ; ATP7A/B : Cooper-transporting P-type ATPase A et B ; ABC : ATP Binding Cassette ; MMR : MisMatch Repair ; NER : Nucleotid Excision Repair ; HRR : Homologous Recombinaison Repair ; Bax : Bcl2 associated protein ; BCL2 : B-cell lymphoma 2 protein ; Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra-large ; SOD : Superoxyde Dismutase.

6) La toxicité du cisplatine :

Malgré son efficacité reconnue depuis des décennies dans les thérapies anti-cancéreuses et son large emploi, le cisplatine présente de nombreux effets indésirables limitant son utilisation (adaptation des doses voire arrêt du traitement). Les administrations répétées en intraveineuse de cisplatine conduisent à son accumulation dans des régions spécifiques du corps dont les reins, le foie, les neurones et l'oreille interne. Cette accumulation induit de la toxicité à l'intérieur de ces organes et cause des dommages parfois irréversibles. On distingue majoritairement la néphrotoxicité, l'ototoxicité, l'hépatotoxicité et la neurotoxicité (Wang *et al.*, 2023).

a) La néphrotoxicité.

Le rein est la principale voie d'excrétion du cisplatine et son accumulation y est plus importante que dans n'importe quel autre organe du corps. La concentration en cisplatine dans les cellules tubulaires rénales est 5 fois plus importante que dans le sérum (Dasari et Tchounwou., 2016 ; Petrović et Todorović., 2016). La néphrotoxicité est dose dépendante et présente un effet cumulatif, ce qui limite considérablement les doses de cisplatine utilisées chez 30 à 40% des patients (Zhang *et al*, 2021). Des lésions des cellules tubulaires rénales surviennent dans 1/3 des patients traités par cisplatine. Aujourd'hui, malgré les mesures de prévention mises en place (hyperhydratation à base de chlorure de sodium en concomitance avec du mannitol, de la furosemide ou du magnésium), la néphrotoxicité reste une problématique majeure (Zhang *et al*, 2021).

b) L'ototoxicité.

Le cisplatine est le médicament le plus ototoxique connu (Petrović et Todorović., 2016). C'est pourquoi, l'ototoxicité fait l'objet de la plus grande attention car elle est irréversible. En effet, les cellules de l'oreille interne des mammifères n'ont pas la capacité de proliférer et ni de se régénérer. Toute lésion est irréversible. 40 à 60 % des patients traités par chimiothérapie à base de sel de platine, comme le cisplatine, présentent des degrés variables d'ototoxicité et 18% d'entre eux présentent des pertes d'audition sévères. Aujourd'hui, de nombreuses molécules sont en cours de développement pour lutter contre l'ototoxicité comme : des peptides bloquant les canaux CTR1/OCT2, des dérivés du platine moins ototoxique, des antioxydants et même des inhibiteurs de l'apoptose, pour lesquels des effets *in vitro* et *in vivo* sur souris ont été montrés (Petrović et Todorović., 2016 ; Wang *et al*, 2023).

c) L'hépatotoxicité.

Le cisplatine diffuse rapidement après administration et s'accumule massivement dans le foie. L'hépatotoxicité est dose dépendante et présente un effet cumulatif, car même les patients traités à de faibles doses de manière répétées vont présenter une toxicité hépatique massive (Dasari et Tchounwou, 2014). L'hépatotoxicité est imputable au stress oxydant généré par le cisplatine (Petrović et Todorović, 2016). Une fois dans les hépatocytes, le cisplatine est biotransformé par le complexe enzymatique cytochrome P450 (CYP450), dont l'enzyme cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) joue un rôle clé dans l'hépatotoxicité. Des études montrent une augmentation considérable du stress oxydant dans des cellules traitées au cisplatine et sur-exprimant CYP2E1, contrairement à des cellules ne l'exprimant

pas (Lu et Cederbaum, 2006). Le cisplatine génère de nombreux radicaux libres, en plus des ROS produits par le CYP450. Ils sont donc majoritairement responsables des lésions hépatiques. De plus, un épuisement des systèmes de compensations de ces ROS est observable dans les hépatocytes. L'accumulation intracellulaire des ROS conduit à l'inflammation et à la production de cytokines pro-inflammatoires, qui activent diverses cascades de signalisation impliquées dans l'initiation du processus apoptotique (Abd Rashid *et al.*, 2021).

d) La neurotoxicité.

La neurotoxicité est le problème limitant la dose utilisée de cisplatine le plus fréquent (Fennell *et al.*, 2016). La neuropathie périphérique induite est une neuropathie sensorielle, qui affecte 30 à 50% des patients, dont 10% d'entre eux possèdent des symptômes invalidants. Elle est dose dépendante et est associée à des doses cumulatives supérieures à 300-350 mg/m². Elle se manifeste par des engourdissements, des picotements (paresthésie), des sensations de brulures, des douleurs et une diminution de la sensibilité des doigts et des orteils. Ces symptômes peuvent persister pendant plusieurs mois malgré un arrêt du traitement et même s'aggraver au cours du temps (Santos *et al.*, 2020). Le cisplatine s'accumule principalement dans les neurones sensoriels du ganglion de la racine dorsale, car il n'y a pas de barrière hématoencéphalique, que la quantité de glutathion détoxifiant est réduite et enfin, l'influx du cisplatine est favorisé par une expression abondante de transporteurs cationiques (OCT). Les ROS générés par le cisplatine et les dommages à l'ADN nucléaire et mitochondriale, entraînent la mort par apoptose des cellules neuronales, perturbant la transmission des messagers nerveux et induisant la dégénérescence axonale (Petrović et Todorović, 2016 ; Santos *et al.*, 2020).

A ce jour, malgré quelques traitements utilisés pour prévenir la neurotoxicité, aucun n'a réellement montré d'efficacité. Les patients souffrent donc souvent de lésions nerveuses progressives, persistantes, souvent irréversibles et limitant la dose lors de l'administration de médicaments antinéoplasiques (Hu *et al.*, 2019).

IV. Généralités sur les mucines.

Les cellules vivent en contact avec le milieu extérieur et sont constamment exposées à des agressions (micro-organismes, polluants, ou encore toxines). Au cours de l'évolution, des systèmes de défenses se sont développés, dont la formation d'un gel visco-élastique appelé mucus. Pendant longtemps, peu de choses étaient connues sur ce gel et sa composition. Mais l'essor de nouvelles techniques a permis d'étudier ses constituants principaux : les mucines (Moniaux *et al.*, 2001).

Les mucines sont une famille hétérogène de grandes O-glycoprotéines, à haut poids moléculaires (> 200 kDa), exprimées au niveau de nombreux épithélium de l'organisme : voies respiratoires, système génito-urinaire, système gastro-intestinal et système oculo-vestibulaire. Elles sont produites par une grande variété de cellules épithéliales sécrétrices et par les leucocytes (Kasprzak et Adamek., 2019). L'expression des mucines est variable dans le temps et dans l'espace : elle dépend du type cellulaire mais aussi du stade de développement du tissu (Dhanisha *et al.*, 2018). Leur rôle principal est de former le gel de mucus : une couche protectrice visco-élastique à la surface des organes en contact avec l'extérieur, afin de créer une barrière physique contre les agents pathogènes, réguler le pH et permettre l'hydratation des tissus sous-jacent. Les mucines possèdent une structure commune et caractéristique : le gène de la mucine est traduit en une chaîne polypeptidique, appelée apomucine, décorée par de nombreuses glycosylations. La masse moléculaire des mucines est importante et est représentée à 70-80% par les résidus oligosaccharidiques (Kasprzak et Adamek., 2019). Ces résidus se lient à des acides aminés Proline, Sérine et Thréonine, formant un motif spécifique appelé PTS, conservé dans toutes les mucines. Ces acides aminés PTS sont rassemblés dans des domaines de répétitions en tandem (TR). Cependant, le nombre de répétitions et la longueur de ces domaines TR sont spécifiques à chaque mucine. De plus, pour certaines mucines, le nombre de TR est variable d'un individu à l'autre, générant un polymorphisme VNTR (Variable Number Tandem Repeat) (Moniaux *et al.*, 2001 ; Dhanisha *et al.*, 2019).

Chez l'Homme, les gènes de mucine sont représentés par le sigle MUC suivi d'un numéro qui reflète l'ordre de découverte du gène. On distingue 22 gènes codants pour des mucines, allant de MUC1 à MUC22 (Dhanisha *et al.*, 2018). De par leur structure, leur fonction et leur localisation, les mucines sont classées en deux groupes : les mucines sécrétées et les mucines membranaires (Figure 19) (Dhanisha *et al.*, 2018). Parfois, une autre classification des mucines est possible, discriminant les mucines formant du gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19) des mucines ne formant pas de gel de mucus (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 et

Mucines membranaires

MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21

Signal Sequence, TR, DM, EGF, SEA, TM, CT

Mucines sécrétées

MUC2, MUC5AC, MUC6, MUC7, MUC19

Cysteine-Rich Domain, Autocatalytic Proteolytic Cleavage, TR, DM, EGF, C-rich

Epithelial cell surface

1) Les mucines sécrétées :

a) Les mucines gélifiantes.

68

respiratoire, digestif, urinaire, génital, gastro-intestinal et oculo-vestibulaire. Elles se caractérisent par leur haut poids moléculaire (de 5 à 40MDa), leur taille (600 à 900 nm) et leur proportion de glycosylation (50 à 80% du poids moléculaire) (Dhanisha *et al.*, 2019). D'un point de vue structural, ces mucines partagent des caractéristiques communes (Figure 20A) :

- Un core protéique ou apomucine riche en proline, sérine et thréonine regroupés en motifs PTS répétés sur lesquels se greffent les *O*-glycosylations. Ces motifs PTS sont intercalés par des domaines riches en cystéines.
- Des régions C-terminale et N-terminale ne contenant pas de motifs PTS répétés, légèrement *O*-glycosylées, et riches en domaines cystéine (CK : Cystein-Knot). Elles portent quelques *N*-glycosylations. Ses régions contiennent des domaines D (Von Willebrand-D-like domain) et un domaine SEA (Sea urchin Sperm protein enterokinase and Agrin domain) composé d'environ 120 acides aminés, largement présents dans les protéines *O*-glycosylées.

Les différents domaines CK et D, au niveau de l'apomucine et des extrémités distales, servent à l'oligomérisation des mucines, par formation de ponts disulfures au sein du réticulum endoplasmique, nécessaire à la formation du mucus (Kufe., 2009 ; Jonkheere *et al.*, 2014 ; Pinzón-Martín *et al.*, 2019).

b) Les mucines non gélifiantes.

MUC7 (4q13.3), MUC8 (12q24.33) et MUC9 (1p13.2) appartiennent au sous-groupe des mucines non formatrices de mucus. Ces petites mucines sont sécrétées sous forme de monomères par des cellules spécialisées et ne s'oligomérisent pas (Jonkheere *et al.*, 2014 ; Dhanisha *et al.*, 2019). En comparaison aux autres mucines, elles possèdent une architecture très simple. Par exemple, le gène codant pour MUC7 mesure 10kb et comporte seulement 3 exons. L'ADNc (ADN complémentaire) résultant code pour une apomucine de 377 acides aminés, de seulement 39 kDa. MUC7 se compose (i) d'un domaine central constitué de 5 à 6 répétitions en tandem du motif PTS, sur lesquels se greffent des résidus oligosaccharidiques, (ii) une extrémité N-terminale composée d'un domaine histidine-like avec un segment leucine-zipper, suivi d'un domaine modérément *O*-glycosylé, et enfin, (iii) une extrémité C-terminale comportant un segment leucine-zipper. Les régions distales N – et C-terminales, ne possèdent pas de domaines riches en cystéines. De ce fait, cette mucine ne peut pas former de multimères (Figure 20B) (Moniaux *et al.*, 2001). MUC8 est une mucine majeure des voies respiratoires et se compose d'une chaîne polypeptidique de 313 acides aminés. Cette séquence contient deux types de répétitions consensus riches en proline, sérine et thréonine, mais aussi en alanine et glycine. MUC9 est une mucine non gélifiante uniquement exprimée dans l'appareil reproducteur féminin. Le gène de MUC9 code pour la protéine oviductine, spécifique de l'oviducte, impliquée dans la protection des

trompes de Fallope et de l'embryon précoce. Il s'agit d'un polypeptide de 678 acides aminés, comportant 4 sites de *N*-glycosylation, 2 sites de *N*-myristoylation et plusieurs sites de phosphorylation (Dhanisha *et al.*, 2019).

2) Les mucines membranaires :

Les mucines membranaires sont des protéines ancrées à la membrane de grande taille (jusqu'à 2 000 nm pour MUC4) et largement étendue au-delà du glycocalyx (Hilkens *et al.*, 1992). Elles se composent d'une région extracellulaire densément décorée de glycanes, d'un domaine membranaire unique hydrophobe, et d'une queue cytoplasmique en position C-terminale. Elles regroupent les mucines MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC14, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21 et MUC22 (Dhanisha *et al.*, 2019). En condition pathologique, en fonction de leur localisation et de leur structure à la surface de la cellule, elles jouent un rôle dans les interactions cellule-cellule, cellule-MEC (matrice extracellulaire) (Jonkheere *et al.*, 2014) et dans la signalisation cellulaire, après perception de stimuli externes, engendrant différents types de réponses (prolifération, croissance, différenciation ou apoptose) (Dhanisha *et al.*, 2019). Elles sont synthétisées sous forme d'un polypeptide précurseur qui subit un clivage autoprotéolytique, générant un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal transmembranaire, unis de manière non covalentes. Elles comportent les caractéristiques communes aux mucines, avec des répétitions du motifs PTS au niveau de leur domaine extracellulaire, bien que le nombre de répétitions soit variable entre les mucines, mais aussi variable d'un individu à l'autre, générant un polymorphisme VNTR. Le domaine extracellulaire des mucines membranaires comporte des domaines SEA très conservés ou des domaines EGF-like, présentant des homologies de structures avec le facteur de croissance à l'EGF et autres molécules apparentées (Kasprzak et Adamek., 2019 ; Dhanisha *et al.*, 2019). La taille des queues cytoplasmiques est variable, allant de 22 acides aminés pour MUC4 à 80 acides aminés pour MUC17 (Figure 20C). Des différences sont observables dans les queues cytoplasmiques : MUC1 à une longue queue cytoplasmique comportant des résidus acides aminés potentiellement phosphorylables (Hattrup et Gendler., 2008), alors que MUC3, MUC12 et MUC17 possèdent des motifs PDZ (Malmberg *et al.*, 2008).

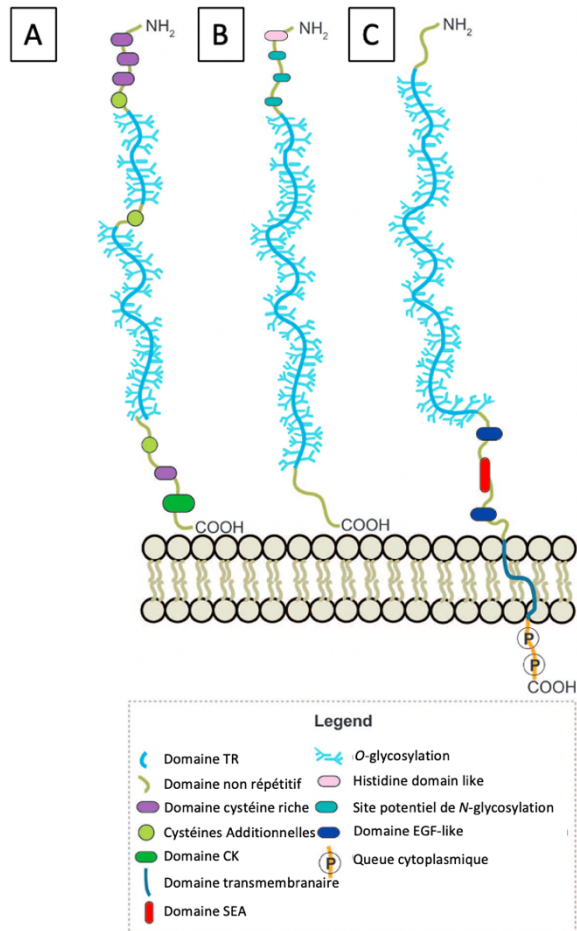


Figure 20 : Représentation schématique des différents types de mucines et de leur structure, d'après Pinzón-Martín *et al.*, 2019. **A)** Mucine gélifiante, **B)** Mucine non gélifiante et **C)** Mucine membranaire. TR : Tandem Repeat ; CK : Cystein Knot ; SEA : Sea urchin Sperm protein enterokinase and Agrin domain ; EGF : Epidermal Growth factor.

V. Mucine 1 (MUC1).

1) Expression de MUC1 :

MUC1, aussi connue sous le nom d'épisialine, PEM (Polymorphic Epithelial Mucin), EMA (Epithelial Membrane Antigen), HMFG (Human Milk Fat Globule) ou CD227 (Cluster Differentiation 227) (Dhanisha *et al.*, 2019), est une large O-glycoprotéine transmembranaire de type I, à un seul passage membranaire. Elle est exprimée à la surface des cellules épithéliales glandulaires ou luminales, de nombreux organes du corps humain : glandes mammaires, œsophage, estomac, duodénum, pancréas, utérus, prostate, poumon et dans certaines cellules hématopoïétiques (Hattrup et Gendler, 2008 ; Gendler, 2001 ; Gendler et Spicer, 1995). Elle possède un large domaine extracellulaire hautement O-glycosylé, qui s'étend jusqu'à 200-500 nm, bien au-delà du glycocalyx (10 nm).

2) Structure du gène MUC1 et sa régulation :

a) Structure du gène de MUC1.

MUC1 est la première mucine à avoir été clonée et est la mieux caractérisée (Gendler *et al.*, 1987 ; Moniaux *et al.*, 2001). Elle est codée par le gène *MUC1* situé dans le bras long (q) du chromosome 1 en position 21 (1q21-24) (Dhanisha *et al.*, 2019). Le gène de MUC1 comporte 6 introns et 7 exons, répartis en deux groupes : les exons 1 à 3 codent pour la partie extracellulaire de MUC1 et les exons 4 à 7 codent pour la partie transmembranaire de MUC1. De manière, plus précise, (i) l'exon 1 code pour le peptide signal, (ii) l'exon 2 code pour le domaine central contenant le VNTR, (iii) l'exon 3 code pour la partie C-terminale de la partie extracellulaire de MUC1 et (iv) ensemble, les exons 4 à 7 codent le domaine transmembranaire de MUC1 et la queue cytoplasmique (Moniaux *et al.*, 2001 ; Nath et Mukherjee, 2014) (Figure 21).

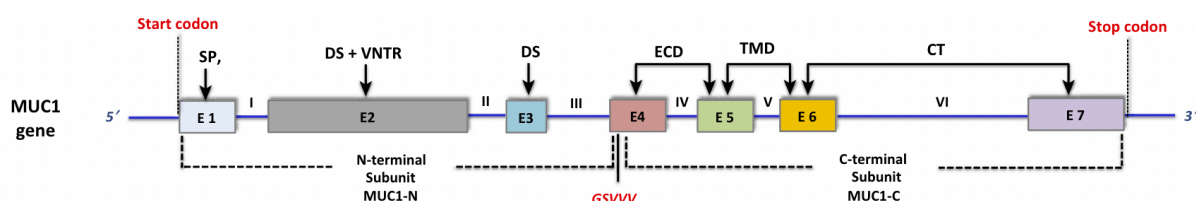


Figure 21 : Représentation schématique de la structure du gène de MUC1, d'après Nath et Mukherjee, 2014.

SP : Signal Peptide ; DS : Degenerate signal ; VNTR : Variable Number Tandem repeat ; ECD : ExtraCellular Domain ; TMD : TransMembrane Domain ; CT : Cytoplasmic Tail.

MUC1 est exprimée à un niveau basal dans de nombreuses cellules épithéliales. Sa transcription est donc fortement régulée au niveau génique par de nombreux facteurs. En effet, le promoteur de *MUC1* contient des régions riches en GC et comporte des éléments *cis*-activateurs omniprésents comme une TATAbox (localisés 25 nucléotides en amont du site d'initiation) ou encore une CCAAT box (Moniaux *et al.*, 2001). Le promoteur de MUC1 possède de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription comme Sp1 (Specificity Protein 1), AP1, 2 et 3 (Activator Protein 1, 2 and 3), NF1 (Nuclear Factor 1), ER (Estrogen receptor), « Milk binding protein factor », NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) (Nath et Mukherjee., 2014). La région -150/-60 contient un site pour Sp1 et une E-box, cruciale pour observer l'expression de MUC1 dans les tissus (Jonckheere et Van Seuningen., 2010). La région -101/-89 interagit avec 2 facteurs de transcriptions : Sp1 et SpA qui reconnaissent la séquence consensus GGCGG. Dans le sein, des travaux montrent un rôle inhibiteur de SpA dans la transcription de MUC1, car Sp1 et SpA sont en compétition pour un même site de liaison (Kovarik *et al.*, 1996). Le promoteur de MUC1 possède des séquences *cis*-régulatrices, pour des voies de signalisation inflammatoires, comme l'IFN γ (Interféron γ) et le TNF α . Dans des lignées cancéreuses mammaires, il a été montré que le promoteur de MUC1 comporte 4 sites de fixations pour les facteurs de transcription STAT (Gaemers *et al.*, 2001). L'IFN γ et le TNF α activent STAT1 et NF- κ B responsables de la surexpression de MUC1 (Lagow et Carson., 2002). MUC1 peut être régulée par le TGF- β 1 au niveau de deux sites d'initiation de la transcription en -520 et -130 (Jonckheere et Van Seuningen., 2010).

b) Régulation d'expression de MUC1.

L'augmentation et la diminution de l'expression de MUC1 résultent, soit d'une augmentation ou diminution de la transcription de son gène, soit d'une perte de sa régulation post-transcriptionnelle.

i) Régulation transcriptionnelle.

Le gène de MUC1 se caractérise par la présence d'îlots CpG dans une large région de 60pb, nécessaire à sa régulation transcriptionnelle. Des études montrent que la méthylation des histones H3K9 et des îlots CpG dans le promoteur de MUC1 interviennent dans la répression de la transcription. La déméthylation et l'acétylation de ces régions conduisent à une augmentation d'expression de MUC1 (Yamada *et al.*, 2008). Dans des cellules cancéreuses mammaires, l'expression de MUC1 est largement corrélée avec son niveau de méthylation : l'hyperméthylation diminue drastiquement les niveaux

d'expression de MUC1, alors que l'hypométhylation est associée à une expression plus importante de MUC1 (Zrihan-Licht *et al.*, 1995).

ii) *Régulation post-transcriptionnelle.*

L'expression de MUC1 est régulée post-transcriptionnellement, car l'ARNm de MUC1 comporte des séquences dites « d'amorçage » de certains microRNAs, de courtes séquences simple brin d'ARN non codant, de 22 nucléotides. A titre d'exemple, l'ARN de MUC1 comporte un site d'amorçage pour miR125b en 3' UTR de sa séquence. La perte d'expression de miR125b, dans des cellules mammaires, contribue à la surexpression de MUC1 (Rajabi *et al.*, 2010). Dans le cancer du poumon, des travaux montrent le rôle de miR128 dans la régulation à la baisse de l'expression de MUC1 (Koh *et al.*, 2017).

3) Structure et synthèse de MUC1 :

Le gène de MUC1 code pour une chaîne polypeptidique unique. Le squelette protéique (apomucine) de MUC1 est synthétisé dans le réticulum endoplasmique rugueux, sous forme d'un précurseur ne contenant pas encore de résidus oligosaccharidiques liés (Apostolopoulos *et al.*, 2015). MUC1 subit un stress conformationnel, conduisant à un clivage autoprotéolytique, entre la glycine et la sérine du motif GSVVV du domaine SEA. Ce clivage génère 2 sous-unités liées de manière non covalente, par des liaisons hydrogènes stables (Kufe., 2022). Les deux sous-unités restent liées pendant les modifications post-traductionnelles et jusqu'à l'adressage à la surface cellulaire (Dhanisha *et al.*, 2019). MUC1 est donc un hétérodimère, comportant un domaine N-terminal extracellulaire (MUC1-N) et un domaine C-terminal transmembranaire (MUC1-C) (Figure 22).

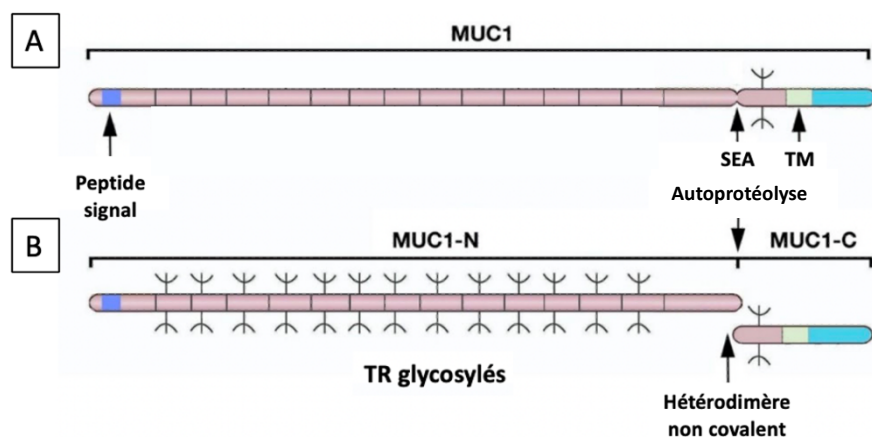


Figure 22 : Représentation schématique de l'hétérodimère MUC1, d'après Kufe., 2022. **A)** MUC1 est traduite sous forme d'une chaîne polypeptidique unique. **B)** Après autoprotéolyse, MUC1 est formée de 2 sous unités unies par des liaisons hydrogènes stables : MUC1-N et MUC1-C.

a) **MUC1-N.**

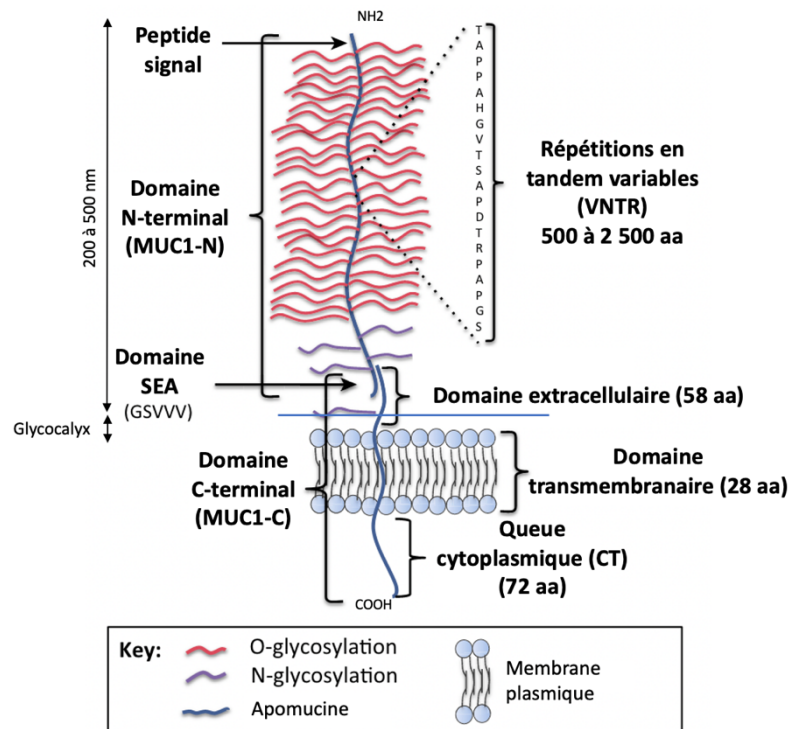


Figure 23 : Représentation schématique de la structure de MUC1, d'après Nath et Mukherjee., 2014 ; Apostolopoulos *et al.*, 2015. MUC1 se compose de 2 sous-unités : MUC1-N et MUC1-C unis de manière non covalente par des liaisons hydrogènes. MUC1-N est particulièrement étendue au-dessus de la membrane, allant au-delà du glycocalyx. Le peptide signal en position N-terminale est nécessaire à l'adressage à la membrane de MUC1. Les O-glycosylations se greffent au niveau du VNTR, au sein de l'appareil de Golgi. Dans sa partie distale ou C-terminale, MUC1-N comporte 5 résidus asparagines, portant des N-glycosylations.

MUC1-N est la sous-unité la plus longue. Elle comporte un domaine N-terminal de 104 acides aminés, contenant le peptide signal en position N-terminale, nécessaire à l'adressage à la membrane (Figure 23) (Apostolopoulos *et al.*, 2015 ; Kufe., 2022). Dans sa partie centrale, MUC1-N comporte le domaine VNTR où vont se greffer les O-glycosylations. Ce domaine est formé de la répétition d'une séquence PTS de 20 acides aminés (HGVTSA PDTRPAGSTAPPA) (Gendler *et al.*, 1987). En Europe du Nord, le nombre de répétitions de ce motif est de 20 à 120, mais de manière plus courante, on retrouve entre 40 et 80 répétitions (Figure 23). La glycosylation est faite de manière séquentielle par des glycosyltransférases dans l'appareil de Golgi. Des N-acétylgalactosamines transférases greffent un premier groupement GalNAc sur l'apomucine. La chaîne oligosaccharidique est allongée par l'ajout de galactose et de N-acétylglucosamine. La chaîne est ensuite terminée par ajout d'un complexe dit Sialyl Lewis (Apostolopoulos *et al.*, 2015). Les O-glycosylations représentent 50 à 90% du poids moléculaire de MUC1 : en effet, le poids moléculaire de MUC1 non glycosylée est de 120 à 225 kDa, alors qu'une

fois glycosylée, son poids moléculaire atteint 250 à 500 kDa. MUC1-N est *N*-glycosylée sur 5 résidus asparagines dans sa partie distale (Nath et Mukherjee., 2014). Enfin, elle se compose d'un domaine C-terminal de 170 acides aminés (Apostolopoulos *et al.*, 2015). A la différence des autres mucines, MUC1 ne possède pas de domaines EGF-like (Gendler *et al.*, 1987).

b) MUC1-C.

MUC1-C est la sous-unité la plus étudiée. Cette sous-unité est plus courte et se divise en 3 parties : un domaine extracellulaire de 58 acides aminés, un domaine transmembranaire hydrophobe de 28 acides aminés et une queue cytoplasmique de 72 acides aminés. Sa partie extracellulaire porte une *N*-glycosylation, faisant varier le poids moléculaire de MUC1-C de 17 à 25 kDa. Le domaine transmembranaire hydrophobe est nécessaire à l'ancrage de MUC1 à la membrane (Kufe., 2022). La queue cytoplasmique est hautement conservée (MUC1-CT). Elle comporte un motif CQC en position juxtamembranaire, nécessaire à son adressage à la surface membranaire (Pemberton *et al.*, 1996) mais aussi à son homodimérisation et sa translocation nucléaire (Figure 24) (Raina *et al.*, 2012). MUC1-CT comporte 7 résidus tyrosines, 9 résidus sérine et 6 résidus thréonine, représentant des sites d'ancrages potentiel pour des protéines, impliquées dans diverses voies de signalisation intracellulaire (Rajabi et Kufe., 2017). Ces résidus sont potentiellement phosphorylables par certaines kinases, ce qui permet de réguler les interactions entre MUC1-C et certains effecteurs, tels que p53 (Singh *et al.*, 2008), PI3K (Raina *et al.*, 2011), la β -caténine (Huang *et al.*, 2005), PLC- γ (Phospholipase C- γ) mais aussi certains récepteurs membranaires comme l'EGFR et des membres de la famille des Erb (Figure 24) (Rajabi et Kufe., 2017). Suite aux différentes phosphorylations, le poids moléculaire de MUC1-C peut atteindre 30 kDa.

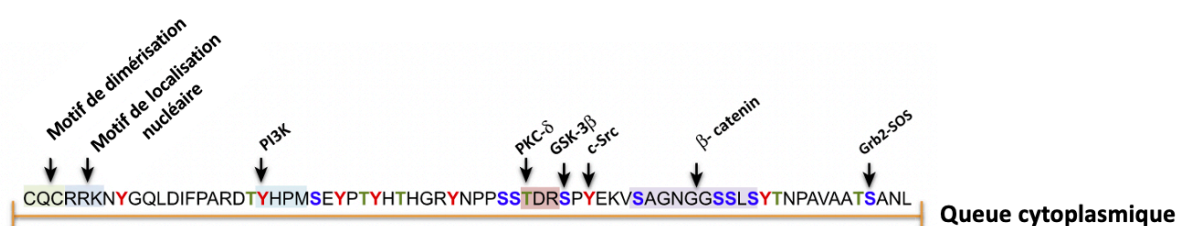


Figure 24 : Séquence en acides aminés de la queue cytoplasmique de MUC1 (MUC1-CT) et mise en évidence des sites de phosphorylations potentielles et d'interactions avec diverses protéines, d'après Nath et Mukherjee., 2014. Le motif CQC est en position juxtamembranaire et est essentiel à la dimérisation de MUC1-C. En rouge, sont mis en évidence les résidus tyrosines (Y), en bleu les résidus sérine (S) et en vert les résidus thréonines (T) potentiellement phosphorylables. Les acides aminés surlignés représentent les séquences cibles des différentes protéines intracellulaires.

4) Fonctions physiologiques de MUC1 :

Dans le tissu sain, grâce à son domaine extracellulaire particulièrement étendu, MUC1 fonctionne comme une barrière physique pour protéger les cellules épithéliales sous-jacentes. En effet, MUC1 forme un maillage serré empêchant les pathogènes, comme les virus et les bactéries, d'atteindre le tissu sous-jacent (Chen *et al.*, 2021). Les résidus oligosaccharidiques de MUC1-N sont chargés négativement et étendent MUC1 jusqu'à 500 nm au-dessus de la surface cellulaire. Cette conformation confère des propriétés antiadhésives à MUC1, permettant le maintien ouvert des lumières canalaire par l'intermédiaire de forces répulsives (Moniaux *et al.*, 2001). En fixant des molécules d'eau au niveau des résidus oligosaccharidiques, MUC1-N intervient dans la lubrification, l'hydratation et la régulation du pH (Chen *et al.*, 2021).

MUC1-N et MUC1-C forme un complexe en communication constante avec le milieu extracellulaire. MUC1 est donc sensible aux stimuli extérieurs ($\text{TNF}\alpha$ et $\text{IFN-}\gamma$) et à la perte de l'homéostasie. La perte de l'homéostasie engendre des forces mécaniques, qui perturbent le complexe MUC1-N/MUC1-C, induisant alors son clivage. Ce clivage se fait en 2 étapes précises et successives. Le premier clivage est extracellulaire et est réalisé par des sheddases de la famille des métalloprotéases, comme MT1-MMP (Membrane Type 1 matrix metalloproteinase), ADAM10 et 17 (A Disintegrin And Metalloproteinase 10 and 17) (Nath et Mukherjee., 2014 ; Kufe, 2022). MUC1-N est relarguée dans le milieu extracellulaire et contribue à la barrière physique protégeant l'épithélium sous-jacent (Figure 25).

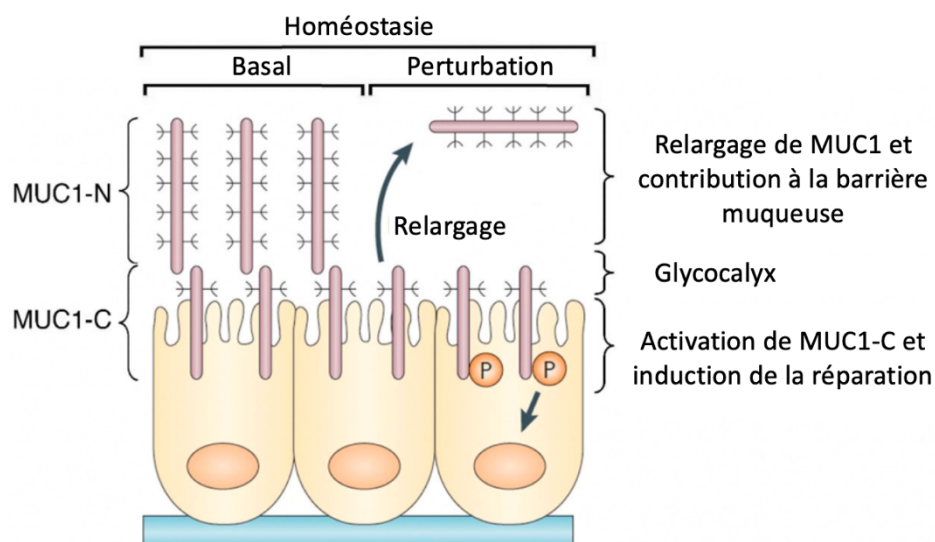


Figure 25 : Représentation schématique de la contribution de MUC1 à la formation de barrière physique formée par le mucus, suite à son clivage par des sheddases de la famille des métalloprotéases, d'après Kufe., 2022.
MUC1-C : Domaine extracellulaire de MUC1 ; MUC1 : Domaine transmembranaire de MUC1.

Suite au premier clivage et au relargage de MUC1-N, MUC1-C est activée et elle peut s'homodimériser au niveau du motif CQC. Après homodimérisation, la partie extracellulaire de MUC1-C peut interagir avec des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) *via* la galectine 3 (GAL3) et promouvoir l'activation des voies de signalisation en aval. MUC1-C homodimérisée, peut être clivée en intracellulaire, au niveau du motif CQC en position juxtamembranaire, par la γ -sécrétase. Après clivage, elle est : soit transloquée au noyau *via* un mécanisme médié par l'importine- β et le complexe nucléopore 62 (NUP62), soit transportée à la membrane externe de la mitochondrie *via* HSP70 et 90 (Heat Shock Protein 70 et 90). Dans le noyau, elle interagit avec de nombreux facteurs de transcription, tels que NF- κ B p65 et ZEB1 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1) induisant ainsi la restauration de l'homéostasie *via* la TEM (Figure 26) (Kufe., 2022).

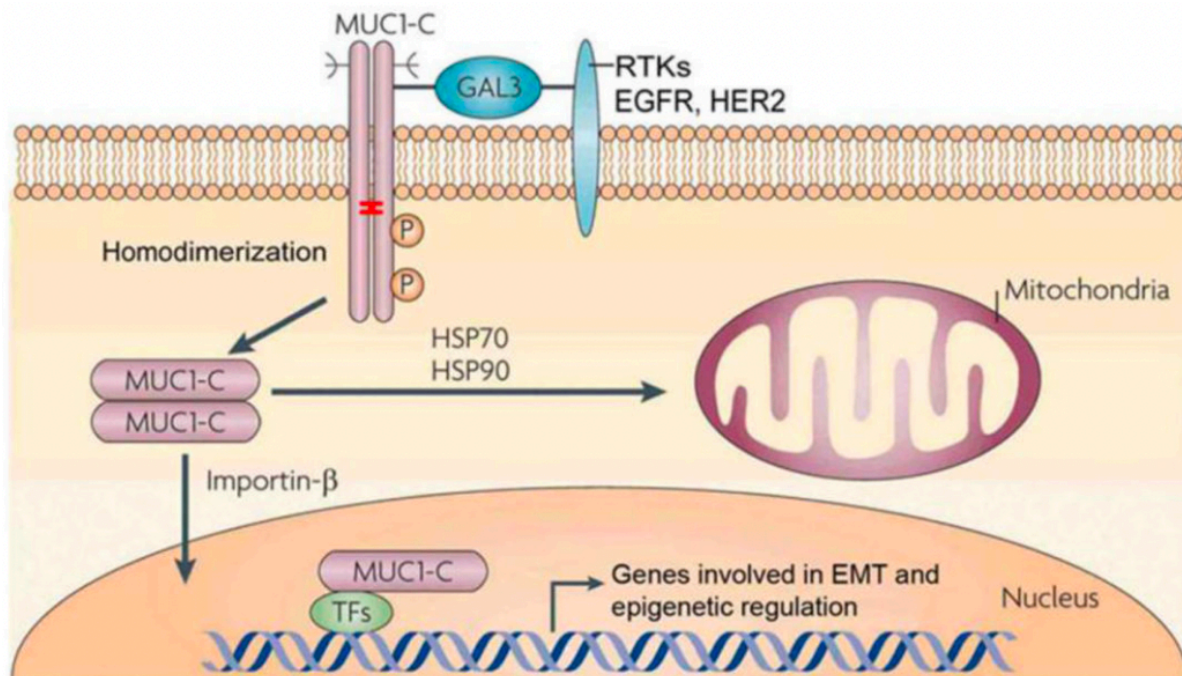


Figure 26 : Représentation schématique de l'activation de MUC1-C après homodimérisation, clivage et sa translocation nucléaire, d'après Rajabi et Kufe., 2017. GAL3 : Galectin 3 ; RTK : Receptor Tyrosine Kinase ; EGFR2 : Epithelial Growth Factor Receptor 2 ; HER2 : Human Epidermal Growth Factor 2 ; HSP70/90 : Heat Shock Protein 70/90 ; TF : Transcription Factor.

5) MUC1 et pathologies non cancéreuses :

Des altérations dans la séquence génique ou protéique de MUC1 et/ou dans la quantité de mucines sont impliquées dans le développement de pathologies non cancéreuses. Ces anomalies perturbent la fonction de barrière du mucus et jouent, ainsi, un rôle dans l'initiation et le maintien de l'inflammation.

C'est notamment le cas de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique, où l'expression de MUC1, anormalement glycosylée, augmente dans l'iléon des personnes malades et est corrélée avec la gravité de la maladie. Les glycosylations anormales sont reconnues par des cellules immunitaires impliquées dans la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL-6. Le TNF- α en activant la voie du NF- κ B régule positivement l'expression de MUC1, créant une boucle positive d'expression de MUC1 et renforçant l'inflammation déjà créée (Hashash *et al.*, 2021).

MUC1 joue un rôle dans le développement de la fibrose pulmonaire. En effet, des études montrent que son expression est augmentée ainsi que la phosphorylation de sa queue cytoplasmique par l'intermédiaire du TGF- β . Cette activation de MUC1-C permet la formation d'un complexe avec la β -caténine, active les gènes cibles de cette dernière, ce qui favorise la transformation des cellules épithéliales alvéolaires et des fibroblastes en myofibroblastes, ainsi que la prolifération des fibroblastes (Milara *et al.*, 2020).

MUC1 est impliquée dans le développement de l'acné néonatale et de l'acné sévère post-adolescence. Il a été montré que la longueur des domaines TR était corrélée avec le développement d'acné sévère (Ando *et al.*, 1998).

MUC1 joue un rôle dans le développement de pathologies rénales, comme la néphropathie tubulointerstitielle (ADTKD : Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease). Cette pathologie résulte de l'accumulation cytoplasmique de MUC1 mal conformée, suite à la duplication d'une cystéine dans son domaine VNTR. Cette duplication engendre un décalage du cadre de lecture et l'apparition prématurée d'un codon STOP, entraînant la perte des domaines en C-terminale (Domaine SEA, domaine transmembranaire et queue cytoplasmique). La séquence protéique mal conformée synthétisée n'est pas fonctionnelle et ne sera pas glycosylée, ni adressée à la membrane et ni recyclée (Dvela-Levitt *et al.*, 2019).

VI. MUC1 et cancer.

MUC1 est sur-exprimée dans 2/3 des cancers confondus, liquides et solides. Les altérations de MUC1 sont donc une des altérations les plus communes dans les cancers humains. Cette surexpression provient de l'amplification du locus de MUC1 et/ou de boucles d'activation du promoteur de MUC1, *via* NF- κ b et d'autres facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'inflammation (Kufe., 2009).

1) MUC1 associée au cancer :

MUC1 associée au cancer est différente de MUC1 exprimée dans les cellules normales, de par ses caractéristiques biochimiques et de par sa distribution cellulaire (Nath et Mukherjee., 2014). MUC1 associée au cancer est hypoglycosylée et présente des chaînes oligosaccharidiques plus courtes (Apostolopoulos *et al.*, 2015). Provenant d'une perte d'activité enzymatique des glycosyltransferases, la glycosylation incomplète des chaînes oligosaccharidiques affecte sa stabilité mais aussi sa localisation. Dans le cancer du sein, il a été montré que la β -glucosaminyltransférase n'était pas exprimée. Cela conduit à l'accumulation de Core-1 disaccharides, servant de substrats à Gal-specific α 3-sialyltransferase et à GalNAc-specific β 6-sialyltransferases (Hanisch et Müller., 2000). Dans le cancer colique, l'enzyme colique normale GalNAc β 3-GlcNAc-transférase (UDP-GlcNAc) n'est pas exprimée (Apostolopoulos *et al.*, 2015). Normalement, MUC1 contient des Core-2 O-glycanes, très ramifiés. MUC1 associée au cancer présente des O-glycanes Core 1 dû à une perte d'activité de la Core-2 β 6-GlcNAc transférase. MUC1 associée au cancer est hautement sialylée, ce qui conduit à une fin d'élongation prématurée, générant des sucres tronqués. L'augmentation de la sialylation provient de l'augmentation d'expression des α 2,3 et α 2,6 -sialyltransferases dans les cellules cancéreuses (Nath et Mukherjee., 2014).

2) MUC1 et progression tumorale :

a) Interaction cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire.

En condition physiologique, MUC1 est exprimée au pôle apical des cellules épithéliales. En réponse à un stress, la perte de la polarisation cellulaire entraîne une redistribution transitoire des protéines de surface (Gendler *et al.*, 2001). Suite à cette redistribution, et de par son encombrement stérique, MUC1 interviendrait dans la perte d'interaction cellule-cellule et cellule-MEC (Hollingsworth et Swanson., 2004).

De nombreuses études montrent que MUC1 est elle-même impliquée dans le processus engendrant la perte de polarité cellulaire. La redistribution des protéines de surface permet à MUC1 d'interagir physiquement avec des protéines, notamment des RTKs comme ERBB2, normalement séquestrés au niveau de la membrane basolatérale (Kufe, 2009). MUC1 peut exacerber l'activation d'ERBB2 et contribuer à la perte des jonctions serrées qui régulent la polarité cellulaire, en définissant la frontière entre les membranes dites apicales, des membranes basolatérales. Les jonctions serrées empêchent la diffusion intramembranaire des structures membranaires dans les cellules polarisées (Wibbe et Ebnet., 2023) (Figure 27).

MUC1 intervient dans la perturbation des jonctions adhérentes, nécessaires au maintien de la morphologie épithéliale. Les jonctions adhérentes sont des complexes d'E-cadhérine, qui participent aux interactions entre les cellules. Les cadhérines de surface interagissent avec α , β , et γ -caténine, qui forment des complexes afin d'interagir avec les filaments d'actines du cytosquelette (Nelson., 2008). La queue cytoplasmique de MUC1 possède la capacité de séquestrer la β -caténine en se liant à elle et de la stabiliser. Ce complexe induit l'activation des gènes cibles de la voie WNT et inhibe la synthèse de l'E-cadhérine, ce qui conduit à la rupture des jonctions adhérentes (Yamamoto *et al.*, 1997 ; Huang *et al.*, 2003). Le maintien de la polarité apico-basale fait également intervenir le complexe Crumbs (CRB). Dans le cancer du sein, après activation, MUC1-C s'associe à ZEB1 et se fixe au promoteur de CRB3, une sous unité de CRB, et réprime sa transcription. MUC1-C réprime également l'expression de l'E-cadhérine, protéine fondamentale des jonctions adhérentes (Figure 27) (Alam *et al.*, 2016).

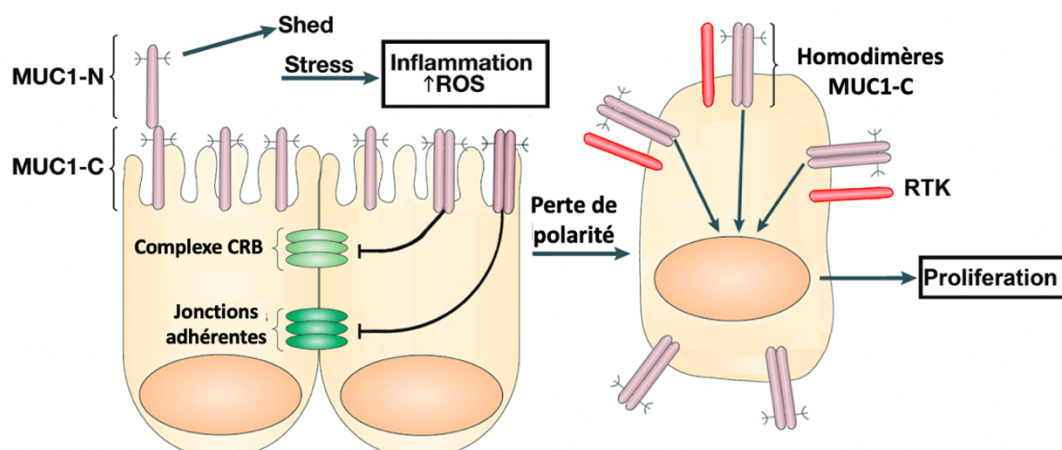


Figure 27 : MUC1 contribue à la perte de polarité cellulaire en perturbant les jonctions serrées et adhérentes, suite à un stress, d'après Kufe, 2020. Lors d'un stress extérieur, le complexe MUC1-N/C subit un stress conformationnel conduisant au clivage de MUC1-N. MUC1-C alors activée, s'homodimérise *via* son motif CQC et induit l'activation de voies de signalisation impliquées dans la déstabilisation des jonctions cellule-cellule et dans la perte de polarité cellulaire. La perte de polarité induit une redistribution des protéines de surface, rendant les interactions physiques possibles entre MUC1-C et des RTKs.

b) Prolifération et survie.

En condition physiologique, MUC1 est uniquement exprimée à la membrane apicale. Suite à la perte de polarité cellulaire et à la redistribution des protéines de surface, MUC1 peut interagir avec des récepteurs et induire l'activation des voies de signalisation en aval, toutes impliquées dans de nombreux processus biologiques comme : la prolifération, la survie, la différenciation, l'inflammation et l'oncogenèse. À titre d'exemple, MUC1 peut interagir physiquement avec les récepteurs à l'EGF, au FGF (Fibroblast Growth Factor), au PDGF (Platelet Derived Growth Factor) ainsi que les récepteurs de la famille des Erb (Kufe., 2009 ; Kufe., 2020). Tous les récepteurs à l'EGF sont sur-exprimés dans le cancer et sont impliqués dans l'initiation et la progression tumorale. MUC1-C peut interagir avec tous ces récepteurs et exacerber leur activation. Au niveau de sa partie extracellulaire, MUC1-C porte un résidu asparagine porteur de *N*-glycosylation, qui fonctionne comme un site de fixation pour la Gal3. La Gal3 forme, alors, un pont entre MUC1-C et l'EGFR. Cette interaction bloque la dégradation d'EGFR et induit l'activation des voies de signalisation associée à l'EGFR, notamment la voie PI3K/AKT impliquée dans la survie et la prolifération (Figure 28) (Shariati et Meric-Bernstam., 2019 ; Raina *et al.*, 2011 ; Kufe., 2013). De plus, MUC1-C contribue à réguler à la hausse l'expression de la Gal3, générant une boucle d'induction d'expression (Merlin *et al.*, 2011 ; Ramasamy *et al.*, 2007). Ensuite, MUC1 médie la production des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de ces récepteurs (CTGF, PDGF A et B), ce qui promeut l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK en aval des récepteurs, potentialisant la prolifération et la survie des cellules tumorales (Hattrup et Gendler., 2006 ; Behrens *et al.*, 2010 ; Raina *et al.*, 2004). La stimulation EGF, permet une association directe entre MUC1-C et l'EGFR. Après clivage et translocation au noyau, MUC1-C cible directement le gène *CCND1* (cycline D1) favorisant la prolifération cellulaire (Bitler *et al.*, 2010). MUC1-CT comporte différents résidus potentiellement phosphorylables, par GSK3 β , Src, l'EGFR et PKC γ . La phosphorylation de MUC1-CT permet de réguler son interaction avec différents effecteurs, dont la β -caténine, principal effecteur de la voie WNT, impliquée dans la prolifération et la progression tumorale (Kufe., 2022). *Via* cette phosphorylation, MUC1-CT se lie directement au domaine SH2 (Silent Hill 2) de PI3K et active la voie AKT/mTOR (Kufe., 2009 ; Kufe., 2013). De la même manière, MUC1-CT active la voie MEK/ERK, *via* la répression de *RASSF1A* (*RAS Associated Domain Family Member 1*), (Rajabi *et al.*, 2019).

Via son motif CQC, MUC1-C peut s'homodimériser pour être transloquée au noyau par l'intermédiaire de l'importine β et de NUP62, ce qui lui confère un rôle dans la signalisation nucléaire et notamment dans l'activation de la voie WNT/ β -caténine, une voie importante dans le développement de cancer. Cette voie contrôle la quantité cytoplasmique de β -caténine, composant clé

des jonctions adhérentes. MUC1-C possède un domaine riche en sérines, ayant des similitudes avec le domaine de liaison à la β -caténine que l'on retrouve dans l'E-cadhérine. Ceci suggère donc que MUC1 interagit directement avec la β -caténine. La stabilisation de la β -caténine par MUC1 (Yamamoto *et al.*, 1997), permet l'activation des gènes cibles de la voie WNT, comme celui de la cycline D1 et du facteur de transcription c-Myc, favorisant la prolifération cellulaire et la survie (Li *et al.*, 2011 ; Kufe., 2013). D'autres études montrent que la phosphorylation de la queue cytoplasmique de MUC1 par GSK3 β , Src, EGFR et PKC γ sur des sites en amont du domaine de liaison de la β -caténine, contribue à sa stabilisation et à l'activation de la voie WNT/ β -caténine (Kufe, 2022). MUC1-C facilite la formation du complexe MUC1/ β -caténine/TCF4 et occupe alors le promoteur *CCND1*, permettant son acétylation et sa transcription (Figure 28). Le ciblage de MUC1 par un siRNA inhibe l'interaction entre MUC1-C et la β -caténine, et diminue la transcription de *CCND1* (Rajabi *et al.*, 2012). Le même mécanisme est retrouvé lors l'activation du promoteur de *MYC* par le complexe MUC1/ β -caténine/ TCF4, dont MUC1 lui-même fait partie de ces gènes cibles, générant une boucle d'induction positive. L'inhibition de MUC1 par shRNA ou CRISPR/Cas9 diminue l'expression de MYC (Bouillez *et al.*, 2016).

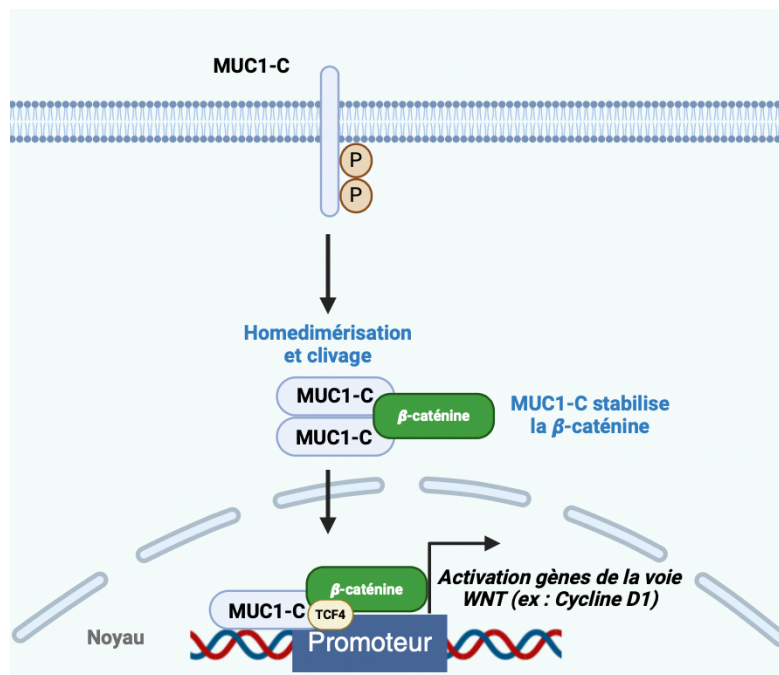


Figure 28 : MUC1 stabilise la β -caténine et permet l'activation de ses gènes cibles dont celui de la cycline D1, favorisant la prolifération cellulaire, d'après Kufe, 2013.

Concernant la survie, MUC1 peut interagir avec NF- κ b, suite à une stimulation par le TNF α . A l'état basale, NF- κ b est exprimé dans le cytoplasme avec ses propres protéines inhibitrices de la famille IKB (IKK α , IKK β et IKK γ). La phosphorylation de I κ B α par le complexe kinase IKB, induit sa dégradation et la libération de RelA qui, par la suite, est transloqué au noyau. Une fois dans le noyau RelA active ses

gènes cibles, tous impliqués dans le développement tumoral (inflammation, croissance et survie) (Hayden et Gosh., 2008). Des études montrent que dans les cellules cancéreuses mammaires, MUC1-C s'associe directement avec IKK β et IKK γ , *via* sa queue cytoplasmique. Cette association favorise la phosphorylation de I κ B α et la libération de RelA, conduisant à l'activation de ces gènes cibles, dont MUC1 fait partie, créant une boucle d'induction positive d'expression de MUC1. Le ciblage de MUC1-CT permet de diminuer ces interactions et diminue l'activation des gènes cibles de cette voie (Thompson *et al.*, 2006 ; Ahmad *et al.*, 2007).

c) L'apoptose.

MUC1 joue un rôle dans le processus apoptotique, que ce soit au niveau de la voie intrinsèque que de la voie extrinsèque.

i) MUC1 et voie mitochondriale ou intrinsèque.

Lors d'un traitement par un agent génotoxique, le cytochrome C est libéré par la mitochondrie dans le cytosol, ce qui permet la formation du complexe apoptosomal avec Apaf1 et l'activation des caspases (Bock et Tait., 2020). Or, des études montrent que MUC1 bloque le processus apoptotique en interagissant avec ses effecteurs. Dans des lignées cancéreuses coliques, il a été montré que suite à son activation et son homodimérisation, MUC1-C peut être clivée puis localisée à la mitochondrie, et plus précisément au niveau de la membrane externe. Cette localisation de MUC1-C à la membrane externe mitochondriale stabilise le potentiel de membrane mitochondrial et perturbe la transduction des signaux, ce qui a pour conséquence de diminuer l'activation de la voie intrinsèque. De plus, MUC1-C est associée à une diminution de la libération de protéines pro-apoptotiques, comme le cytochrome C, Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase, une protéine mitochondriale qui potentialise l'apoptose) et AIF (Apoptosis Inducing Factor), et atténue l'activation de la caspase 3, suite à un traitement au cisplatine. Le ciblage de MUC1 par un siRNA favorise l'apoptose (Ren *et al.*, 2004). Une autre étude montre qu'une interaction directe entre MUC1 et Bax, une protéine cytosolique qui migre à la membrane mitochondriale externe où il s'oligomériser et permet la libération du cytochrome C, est possible (Supruniuk et Radziejewska., 2021). En effet, le motif CQC du domaine cytoplasmique de MUC1 contient deux résidus cystéines. Ces 2 résidus cystéines permettent la liaison de MUC1-C à la cystéine 62 du domaine BH3 de Bax. Suite à cette association, Bax ne peut plus s'homodimériser, ce qui empêche la libération du cytochrome C et supprime donc l'activation de la voie intrinsèque (Ahmad *et al.*, 2012) (Figure 29). En condition cancéreuse, MUC1 possède la capacité

d'interagir avec l'EGFR (Raina *et al.*, 2011). Cette interaction permet l'activation de la voie PI3K/AKT située en aval et à la signalisation du NF- κ b (Andjelic *et al.*, 2000). Mais l'activation de cette voie présente des effets anti-apoptotiques, en inhibant Bad par exemple (Shariati et Meric-Bernstam., 2019). Une autre étude montre que l'interaction de MUC1 et PI3K/AKT diminue la phosphorylation de FOXO3a et inhibe la réponse nécrotique des cellules au stress oxydant (Yin *et al.*, 2004). Enfin, MUC1 inhibe la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN médiée par p53, en se liant directement avec son domaine régulateur, ce qui induit une transcription accrue des gènes d'arrêts de croissance cellulaire comme *p21* et des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Cela a pour conséquence de diminuer l'apoptose (diminution de la transcription de *Bax*) (Wei *et al.*, 2005).

ii) *MUC1 et voie des récepteurs de mort ou extrinsèque.*

La voie extrinsèque repose sur l'activation des récepteurs de la mort cellulaire (Fas et TRAIL), par leur ligand respectif. L'activation de ces récepteurs par leur ligand, permet l'activation des domaines de mort cellulaire associés et l'activation de la caspase 8. L'activation de la caspase 8 induit le clivage de la procaspase 3 et l'induction de l'apoptose. La caspase 8 clive également Bid, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl2, et induit la libération dans le cytoplasme de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux, comme le cytochrome C (Gupta *et al.*, 2012).

Des études montrent que MUC1 peut moduler la voie apoptotique médiée par les récepteurs de mort. En effet, MUC1 est capable d'interagir directement avec la caspase 8, *via* les 20 premiers acides aminés composant sa queue cytoplasmique, bloquant ainsi son recrutement par les domaines de mort cellulaire et son activation. MUC1 peut également interagir avec les domaines de mort cellulaire, entrant donc en compétition avec la caspase 8. En se liant au domaine de mort cellulaire, MUC1 atténue l'activation de la voie extrinsèque et favorise la survie (Figure 29) (Agata *et al.*, 2008). Une autre étude montre que MUC1 peut se lier à JNK1 (c-Jun N-terminale protein Kinase 1), un membre des protéines kinase mitogène de la voie MAPK, *via* sa queue cytoplasmique. Cette interaction induit l'activation de JNK1 et de sa cible c-Jun, après un traitement au cisplatine, et diminue la réponse apoptotique normalement induite (Chen *et al.*, 2013). Plus récemment, l'expression de MUC1 a été corrélée positivement à l'expression de Slug, un facteur de transcription qui promeut la migration et l'invasion en inhibant la transcription de l'E-cadhérine. Slug réprime également l'expression de PUMA et inhibe ses fonctions pro-apoptotiques, favorisant ainsi la survie. Le ciblage de MUC1 par un siRNA a permis de diminuer l'expression de Slug et a été associé à l'induction de l'apoptose et à l'inhibition de la prolifération cellulaire (Zhang *et al.*, 2019).

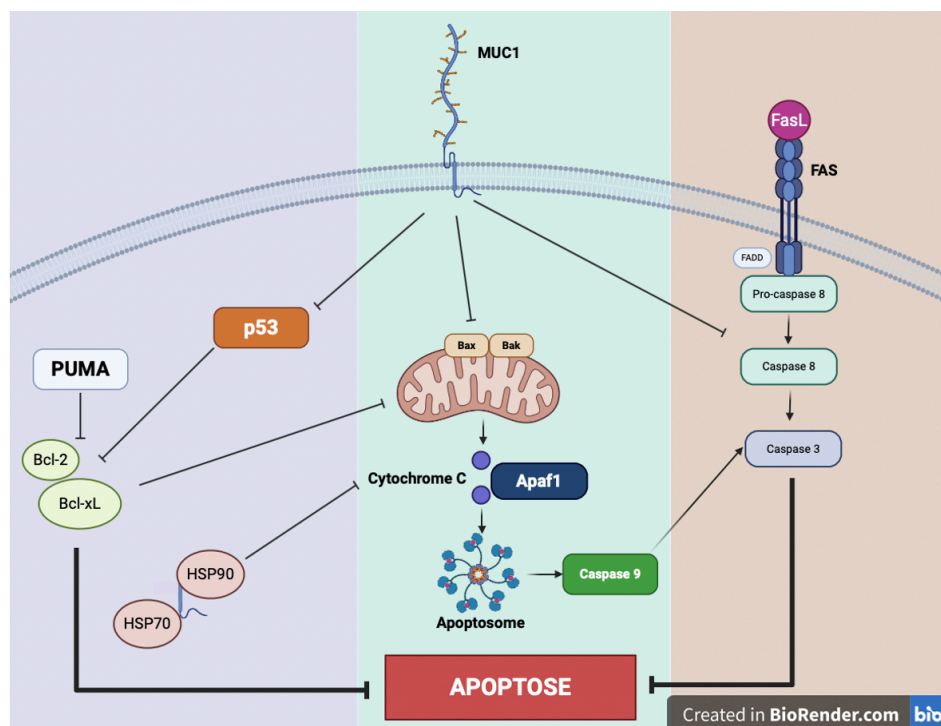


Figure 29 : Représentation schématique du rôle de MUC1 dans la résistance à l'apoptose, d'après Supruniuk et Radziejewska., 2021. MUC1 module la voie apoptotique intrinsèque, en inhibant l'homodimérisation de Bax au niveau de la membrane mitochondriale externe et la libération de cytochrome C. Elle module la voie intrinsèque en interagissant avec p53 *via* son domaine régulateur, ce qui engendre l'inhibition de l'activation de certaines protéines pro-apoptotiques. MUC1 module également la voie extrinsèque en interagissant soit avec les domaines de mort cellulaire, soit avec la caspase 8.

iii) MUC1 et résistance à l'anoïkis.

L'anoïkis est un processus apoptotique particulier, nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire. Il permet l'élimination des cellules épithéliales ou endothéliales ayant perdues leur adhésion à la MEC ou lorsque leur adhésion devient inadéquate. Cette élimination empêche leur dissémination et leur implantation dans des zones inappropriées (ex : métastase). L'initiation et l'exécution de l'anoïkis font intervenir les voies apoptotiques intrinsèque, et extrinsèque, après activation des récepteurs de mort. Néanmoins, les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes permettant de résister à l'anoïkis (Taddei *et al.*, 2011) et MUC1-N semble jouer un rôle non négligeable dans cette résistance (Supruniuk et Radziejewska., 2021). MUC1-N bloque l'initiation de l'anoïkis, en générant un encombrement stérique dû à ses glycosylations et leur grande taille. L'encombrement stérique généré permet de masquer les récepteurs de mort cellulaire, empêchant leur activation (Zaho *et al.*, 2014). Dans des lignées cellulaires cancéreuses coliques, le ciblage des glycosyltransférases impliquées dans

la O-glycosylation de MUC1, permet d'augmenter l'anoïkis et l'activation de la caspase 8. Ceci met donc en évidence le rôle de MUC1-N dans la résistance à l'anoïkis (Piyush *et al.*, 2017).

3) MUC1, TEM et métastases :

L'invasion est une étape précoce, préalable à la dissémination métastatique et à la progression tumorale. Il s'agit d'un processus en plusieurs étapes, permettant aux cellules de se détacher de la membrane basale, de dégrader la MEC et d'envahir les tissus voisins et/ou pénétrer dans la circulation sanguine. La TEM est donc le processus biologique par lequel les cellules cancéreuses acquièrent leur potentiel invasif (Mittal., 2018). La TEM est un processus contrôlé par de nombreux facteurs de transcription, réversible pendant le développement embryonnaire et la réparation des dommages cellulaires. En condition cancéreuse, une TEM aberrante et prolongée contribue au phénotype malin en participant à la plasticité cellulaire, à l'invasion, à la formation de métastases, à l'acquisition du phénotype cellule souche cancéreuse et à la résistance à l'apoptose. De nombreuses preuves montrent que MUC1-C contrôle la TEM, en activant de nombreuses voies de signalisation associées à la plasticité épithéliale et mésenchymateuse (Rajabi et Kufe., 2017).

Le rôle de MUC1 dans la TEM a été étudié par notre équipe et les résultats obtenus dans des lignées cancéreuses rénales, montrent que MUC1-C est une inductrice de la TEM, car elle stabilise l'interaction entre la β -caténine et le promoteur de Snail (Gnemmi *et al.*, 2014). La β -caténine stabilisée par MUC1-C forme un complexe pouvant être transloqué au noyau. Ce complexe réprime l'expression de l'E-cadhérine, protéine associée au phénotype épithélial et nécessaire au maintien de la polarité cellulaire formant les jonctions adhérentes (Kufe., 2009), et induit l'expression de facteurs de transcription inducteurs de la TEM : Snail, Slug et Twist (Twist-related protein) (Roy *et al.*, 2011). MUC1-C en formant un complexe avec NF- κ B p65 induit l'activation de ses gènes cibles, dont *MUC1* lui-même fait partie et *ZEB1*. La formation du complexe MUC1-C/NF- κ B p65 permet l'activation des gènes *DNMT1* et *DNMT3b* (DNA méthyltransferase 1 et 3b), qui vont hyperméthylter les promoteurs de *CDH1* (*Cadherine 1*), (Figure 32) et *RASSF1A*, induisant la perte d'adhésion et la TEM. En formant un complexe avec NF- κ B p65 ou MYC, MUC1-C intervient dans l'activation de PRC1 et 2 (Polycomb Repressive Complex 1 et 2). PRC1 est recruté au niveau des sites PRC2, ce qui permet à MUC1 de réguler la répression induite par PRC1 et 2 de *CDH1*, *CDKN2A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*), *PTEN* et *BRCA1* (Figure 30) (Rajabi *et al.*, 2018).

MUC1 peut se lier directement au facteur de transcription ZEB1 et promouvoir l'occupation du promoteur de ses gènes cibles (Rajabi *et al.*, 2014). Les interactions entre MUC1-C et ZEB1 conduisent à la perte de polarité cellulaire, répriment l'expression de l'E-cadhérine, et induisent la TEM et l'invasion (Rajabi *et al.*, 2014 ; Alam *et al.*, 2016). STAT3 est, aussi, un régulateur clé de la TEM. Il a été montré que MUC1 était un régulateur de l'activation de STAT3 (Figure 30). En effet, MUC1 en formant un complexe avec JAK1 et STAT3, va induire l'activation de STAT3 et l'expression de ses gènes cibles : *CCDN1* et *Twist1*. De plus, STAT3 peut se fixer sur le promoteur de MUC1, créant une boucle positive d'induction de son expression (Ahmad *et al.*, 2011 ; Bose *et al.*, 2024). Comme pour les autres facteurs de transcription, MUC1-C se lie directement à TWIST1, un facteur de transcription impliqué dans la perte d'adhésion cellule-cellule et dans l'acquisition du phénotype invasif (Kufe., 2020).

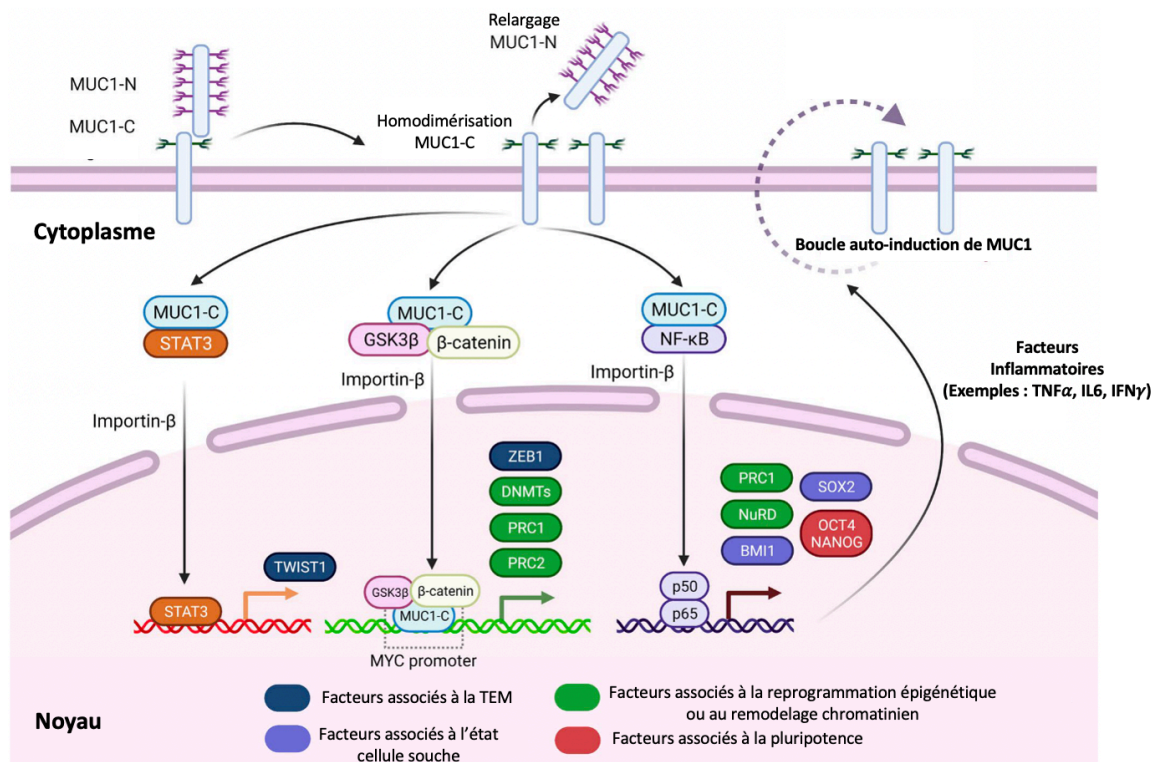


Figure 30 : Schéma récapitulatif des voies impliquées dans la TEM médiée par MUC1, d'après Jin *et al.*, 2022.

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription3 ; TWIST1 : Twist-related protein 1 ; GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 – beta ; ZEB1 : Zinc Finger E-box Binding homeobox 1 ; DNMT : DNA MethylTransferase ; PRC1/2 : Protein Regulator of cytokinesis 1/2 ; NuRD : Nucleosome Remodeling and deacetylase ; SOX2 : SRY-Box Transcription factor 2 ; OCT4 : Octamer-binding Transcription Factor 4 ; TNF α : Tumor Necrosis Factor α ; IFN γ : Interferon γ ; IL-6 : Interleukine 6.

Bien que le rôle de MUC1-C dans la TEM et dans la dissémination métastatique soit bien étudié et reconnu, MUC1-N intervient également dans ce phénomène. En effet, des études montrent dans le cancer du côlon et dans le mélanome, que MUC1 associée au cancer et ses glycosylations aberrantes favorisent l'invasion, en réduisant les contacts cellule-cellule (Wesseling *et al.*, 1997). De manière intéressante, le ciblage des chaînes oligosaccharidiques plus courtes dans MUC1 associée au cancer, par un anticorps ciblant spécifiquement ces épitopes, permet de diminuer la TEM et la formation des métastases dans l'adénocarcinomes pulmonaires (Kato *et al.*, 2021). Les motifs glycaniques modifiés de MUC1 en conditions cancéreuses, serviraient à la dissémination des cellules cancéreuses, en facilitant les interactions avec les molécules d'adhésion des cellules endothéliales (Nath et Mukherjee., 2014).

4) MUC1 et inflammation :

Une inflammation chronique suite à une infection microbienne, une lésion tissulaire ou une irritation par un agent extérieur (exemple : par de la fumée, tabac...), prédispose au développement de cancers (Nath et Mukherjee., 2014). MUC1 est un commutateur de la réponse inflammatoire et son expression est augmentée suite à l'inflammation. En condition cancéreuse, le micro-environnement contient des cytokines pro-inflammatoires, telles que le $TNF\alpha$, l' $IFN\gamma$ et l'IL-6 produites suite à l'exposition à des agents cancérigènes. Ces cytokines sont responsables de l'induction de l'expression de MUC1. En se liant à son récepteur, le $TNF\alpha$ induit l'homodimérisation de MUC1-C, l'activation de la voie du $NF-\kappa B$ et de ses gènes cibles dont MUC1 fait partie. La fixation de l' $IFN\gamma$ et d'IL-6 sur leur récepteur respectif induit l'activation de la voie JAK/STAT, ayant pour gène cible MUC1 (Lagow et Carson., 2002 ; Kufe., 2009). MUC1-C lui-même peut induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le $TNF\alpha$, car le complexe formé par MUC1-C et $NF-\kappa Bp65$ est colocalisé sur leurs régions promotrices (Cascio *et al.*, 2011). Ceci génère donc une boucle promotrice de l'inflammation par la production de cytokines pro-inflammatoires par MUC1-C et l'expression de MUC1 par les voies associées à ces cytokines. L'activation prolongée des voies $MUC1-C \rightarrow NF-\kappa B$ et $MUC1-C \rightarrow STAT3$ favorisent un état inflammatoire chronique, propice au développement tumoral.

MUC1 est en contact constant avec le milieu extracellulaire, grâce à son domaine extracellulaire. Ce milieu extracellulaire se compose d'une diversité de types cellulaires, dont des cellules immunitaires. Les O-glycosylations de MUC1 associée au cancer favorisent l'inflammation, contrôlent le recrutement des cellules inflammatoires et forment un paysage immunitaire différent. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le $TNF\alpha$, *via* l'action du complexe MUC1/ $NF-\kappa Bp65$,

permet le recrutement de cellules inflammatoires comme les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Ces cellules recrutées sont donc une source supplémentaire de cytokines inflammatoires, renforçant l'inflammation (Cascio et Finn., 2016).

5) MUC1 et métabolisme :

Le métabolisme aberrant du glucose est une des caractéristiques du cancer. En effet, le métabolisme des cellules normales n'est pas suffisant en condition cancéreuse et les cellules doivent opérer des changements dans leur métabolisme afin de pouvoir proliférer et survivre. Le microenvironnement tumoral est généralement pauvre en nutriments et hypoxique, rendant la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses nécessaire, en faveur de l'absorption du glucose et d'une régulation à la hausse de l'activité glycolytique aérobie. L'hypoxie rencontrée dans les tumeurs stabilise l'activité des facteurs inductibles par hypoxie (HIF). Ces facteurs reprogramment le métabolisme des cellules tumorales afin de permettre leur prolifération accrue et leur survie (Chaika *et al.*, 2012). HIF1 α est un facteur de transcription au rôle fondamental dans la survie en conditions hostiles des cellules cancéreuses, car il médie la voie glycolytique. MUC1-C est connue pour jouer un rôle dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses, notamment en interagissant et en stabilisant HIF1 α . MUC1-C stabilise HIF1 α en interagissant avec le co-activateur p300 et permet l'occupation des promoteurs des gènes glycolytiques cibles comme *GLUT1* (Glucose Transporter 1), *PDK1* (3- Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1) et *PKM2* (Pyruvate Kinase M2). De plus, HIF1 α peut se lier au promoteur de MUC1 et induire son expression (Aubert *et al.*, 2009 ; Semenza, 2011). MUC1-C peut également stabiliser indirectement HIF1 α : MUC1 module le flux métabolique global et permet l'hydroxylation des prolines de HIF1 α par des prolyl-hydroxylases, ce qui le stabilise (Mehla et Singh., 2014).

Outre la stabilisation de HIF1 α , MUC1 intervient dans la régulation de la glycolyse aérobie. En interagissant avec des RTKs à la membrane, MUC1-C permet l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, connue pour engendrer l'expression de transporteurs du glucose et de stimuler certaines enzymes glycolytiques, dont l'hexokinase et la phospho-fructokinase. *Via* son domaine cytoplasmique, MUC1-C interagit directement avec PKM2, l'enzyme catalysant la dernière étape irréversible de la glycolyse, et accentue la production d'ATP potentiellement utilisable par la cellule (Kosugi *et al.*, 2011).

Plusieurs équipes montrent que MUC1 promeut aussi la phosphorylation oxydative en se liant directement au domaine régulateur de p53. p53 diminue la glycolyse aérobie, en régulant à la baisse

l'expression de certains transporteurs du glucose, et favorise la phosphorylation oxydative dans les cellules cancéreuses, en régulant positivement l'expression de SCO2 (Synthesis of cytochrome C oxidase) (Madan *et al.*, 2011 ; Mehla et Singh., 2014).

MUC1 régule la voie des pentoses phosphates, une voie générant des riboses et des équivalents réduits comme le NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen), nécessaire à la synthèse des nucléotides, des acides gras et des stéroïdes des cellules à prolifération rapide. Il a été montré dans des cellules cancéreuses pancréatiques que MUC1 augmente l'activité de la voie des pentoses phosphates (Chaika *et al.*, 2012), en augmentant l'apport en glucose à l'intérieur des cellules et en diminuant l'activité de PKM2 (Kosugi *et al.*, 2011).

MUC1 intervient dans la régulation à la hausse du métabolisme des lipides, composant principaux des diverses membranes. Dans des cellules cancéreuses mammaires, il a été mis en évidence une corrélation positive entre l'expression de MUC1 et certains gènes du métabolisme lipidique (Pitroda *et al.*, 2009). Ces résultats sont appuyés par une étude réalisée dans le carcinome rénal à cellules claires, où la surexpression de MUC1 est corrélée à une accumulation intracellulaire de longues chaînes lipidiques essentielles (Lucarelli *et al.*, 2022).

6) MUC1 et angiogenèse :

Au-delà des adaptations métaboliques, les cellules ont développé d'autres mécanismes pour survivre et proliférer dans l'environnement pauvre en nutriments et en oxygène qu'est la masse tumorale. En effet, les cellules s'adaptent à cet environnement en induisant l'expression de facteurs pro-angiogéniques. Ces facteurs pro-angiogéniques favorisent la formation et le remodelage de vaisseaux sanguins. Sous hypoxie, MUC1 induit l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A), le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) ou le PDGF-B par activation de diverses voies de signalisation cellulaire dont MAPK, PI3K/AKT/mTOR et JAK/STAT (Khodabakhsh *et al.*, 2021). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'expression de MUC1 est positivement corrélée à l'expression du VEGF (Woo *et al.*, 2012), par activation de la voie PI3K/AKT, de manière dépendante ou non de HIF1 α (Karar et Maity., 2011). L'interaction de MUC1 avec la β -caténine induit l'expression de gènes cibles, dont PDGF-B fait partie (Woo *et al.*, 2012).

De manière plus récente, une équipe montre que MUC1 est une inductrice de l'angiogenèse, en induisant l'expression de VEGF, de VEGF-R et de neuropiline 1 (NRP1), un corécepteur du VEGF, dans le

carcinome canalaire pancréatique. De plus, les glycosylations aberrantes de MUC1 associée au cancer, permettent le démasquage de ces récepteurs. Ceci facilite leur activation par le VEGF et favorisant le remodelage vasculaire et la croissance (Zhou *et al.*, 2016).

7) MUC1 et « checkpoints immunitaires » :

Les cellules cancéreuses possèdent la capacité d'échapper à la surveillance immunitaire, empêchant ainsi leur reconnaissance et leur destruction. Cet échappement est médié par 2 protéines de surface : PD-L1 et CTLA4, qui vont modifier le micro-environnement immunitaire tumoral pour permettre la survie et la prolifération des cellules tumorales (Figure 5, page 38). En plus de toutes ses autres fonctions, MUC1 a la capacité d'interférer dans cette modulation, favorisant l'échappement des cellules cancéreuses à la surveillance immunitaire. Les mécanismes impliqués dans cette évasion immunitaire médiée par MUC1 sont au cœur des recherches aujourd'hui (Figure 31).

Le rôle de MUC1 dans l'évasion immunitaire a longtemps été étudié et dans différents cancers. En effet, en 1999, une équipe montre que MUC1-N, inhibe la prolifération des lymphocytes T en les bloquant probablement en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Ce blocage empêche leur activation et entraîne l'inhibition de leurs fonctions suppressives (Chan *et al.*, 1999). Les mécanismes associés n'ayant pas été compris et il a fallu attendre 2017 pour que les premiers éléments de réponse soient apportés. L'équipe du Dr. Kufe montre dans un modèle de cancer pulmonaire non à petites cellules, que MUC1-C induit l'expression de PD-L1, en se fixant sur son promoteur en association avec NF- κ Bp65. Ils montrent également qu'en s'associant avec NF- κ Bp65, MUC1-C réprime l'expression de l'IFN γ , de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) et du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor), des cytokines associées à l'inflammation. L'ensemble des résultats suggèrent un rôle immunosuppresseur de MUC1 (Bouillez *et al.*, 2017 a). Dans une publication ultérieure de la même équipe, le ciblage de MUC1 par le GO-203, un peptide empêchant l'homodimérisation de MUC1-C (voir p 103), *in vitro* et dans un modèle murin syngénique, (i) diminue l'expression de PD-L1, (ii) permet de restaurer les fonctions suppressives des lymphocytes T CD8⁺ (LTCD8⁺) et (iii) permet d'augmenter l'expression du GM-CSF (Bouillez *et al.*, 2017 b). Des résultats allant dans le même sens ont été obtenus dans un modèle de cancer du sein triple négatif, où MUC1-C est impliquée dans le recrutement de MYC et de NF- κ Bp65, sur le promoteur de *PD-L1* augmentant, ainsi, sa transcription. PD-L1 ainsi exprimé conduit à l'évasion immunitaire et diminue la survie globale. Le ciblage de MUC1-C permet d'augmenter l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur et de restaurer l'activité cytotoxique des LTCD8⁺ (Maeda *et al.*, 2018). Dans le cancer colique, l'expression de MUC1-C induit

une accumulation de lymphocytes T régulateurs (Tregs) et de TAMs (Tumor Associated Macrophages). L'inhibition de MUC1 diminue la proportion de cellules immunosuppressives et restaure les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T (Figure 31) (Sheng *et al.*, 2022).

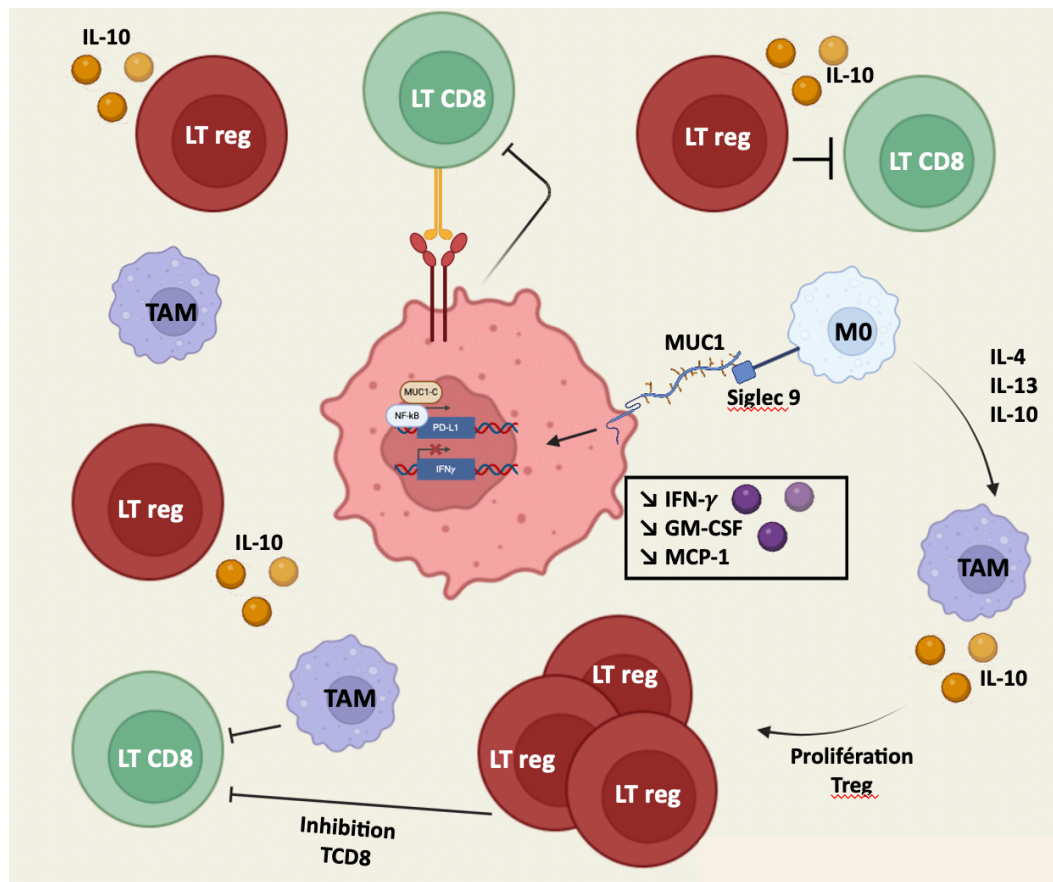


Figure 31 : Représentation schématique du rôle de MUC1 dans l'évasion immunitaire, d'après Bouiliez *et al.*, 2017 a ; Bouiliez *et al.*, 2017 b ; Sheng *et al.*, 2022 ; Beatson *et al.*, 2020. MUC1-C clivée, interagit avec le NF- κ B, induit l'activation du promoteur de PD-L1 et inhibe l'expression de cytokines inflammatoires (IFN- γ , GM-CSF et MCP-1), diminuant le recrutement de cellules immunitaires. PD-L1 ainsi exprimé, interagit avec PD-1 des lymphocytes T CD8 (LTCD8) et inhibe leur activation et leur prolifération. MUC1-N peut interagir avec les macrophages M0 *via* le motif Siglec-9, ce qui induit l'expression de PD-L1 et la conversion des macrophages M0 en TAMs, producteurs d'IL-10. IL-10 induit le recrutement et l'accumulation de lymphocytes T régulateurs (Tregs), impliqués dans l'évasion immunitaire, en induisant l'anergie des LTCD8. Ils sont eux-mêmes producteurs d'IL-10, ce qui renforce l'évasion immunitaire.

D'autres équipes se sont intéressées au rôle de MUC1-N dans l'évasion immunitaire. En effet, en condition cancéreuse MUC1 présente des glycosylations dites aberrantes, générant des extrémités pouvant être associées à des antigènes, reconnus par différents types cellulaires. C'est notamment le cas des macrophages M0 qui se lie à MUC1-N *via* la protéine Siglec-9. Cette interaction induit l'expression de PD-L1 et la conversion des macrophages M0 en macrophages de type M2 ou TAMs. Ces

TAMs inhibent les fonctions des lymphocytes T, permettent le recrutement de neutrophiles et promeuvent un microenvironnement immunosuppresseur (Figure 31) (Beatson *et al.*, 2020). MUC1-N et ses glycosylations peuvent masquer les antigènes normalement reconnus par les cellules immunitaires, empêchant l'activation et l'amplification de ces dernières (Apostolopoulos *et al.*, 2015).

Un autre immune checkpoint existe : il s'agit de CTLA4. Peu de choses ont été décrites sur MUC1 et CTLA4, mais quelques publications montrent que le ciblage de MUC1 permet de diminuer l'expression de CTLA4. En utilisant un vaccin à ARNm dirigé contre MUC1, une équipe montre que le ciblage de MUC1, induit une diminution d'expression de CTLA4 ainsi qu'une diminution de la proportion de lymphocytes T régulateurs (Tregs) et de TAMs (Lin *et al.*, 2022).

8) MUC1 et chimiorésistance :

MUC1 est sur-exprimée dans 2/3 des cancers humains et cette surexpression a été associée à l'acquisition de la résistance aux traitements anti-cancéreux (Kufe., 2009). En 2004, l'analyse de tissus tumoraux de patients a permis de définir MUC1 comme un biomarqueur de la résistance dans le cancer de l'ovaire, où son accumulation cytoplasmique était corrélée avec la résistance aux chimiothérapies à base de sels de platine (Takano *et al.*, 2004). La même année, l'équipe du Dr. Kufe a mis en évidence le rôle de MUC1 dans la résistance au cisplatine *in vitro* et *in vivo*, en diminuant la libération de cytochrome C et l'activation de la caspase 3, mais aussi en bloquant les voies de mort intrinsèque et extrinsèque induite par le cisplatine. Le ciblage de MUC1 par un siRNA permet de sensibiliser les cellules au cisplatine (Ren *et al.*, 2004). Depuis, de nombreuses études ont été menées afin d'élucider comment MUC1 induit cette résistance, non seulement aux chimiothérapies mais aussi aux thérapies ciblées. Trois grands mécanismes communs ont été mis en évidence : la diminution de l'accumulation intracellulaire des drogues, le changement du métabolisme et l'évitement de l'apoptose induite par les dommages à l'ADN (Jin *et al.*, 2022).

a) Diminution de l'accumulation intracellulaire des drogues.

Dans le cancer du pancréas, la surexpression de MUC1-C est associée à l'augmentation de l'expression de certains transporteurs de la famille ABC, des transporteurs à efflux à large spectre, dont ABCC1 (le plus exprimé), ABCC3, ABCC5 et ABCB1. MUC1-C régule à la hausse l'expression de ABCC1 de manière dépendante ou non de la voie PI3K/AKT. En effet, elle possède la capacité de s'associer

directement avec des facteurs de transcription ayant pour cible le promoteur de ABCC1 (Figure 32) (Nath *et al.*, 2013). Une autre équipe travaillant sur les cancers de la sphère uro-génitale a mis en évidence le rôle de MUC1-C dans la résistance au cisplatine. MUC1 induit la résistance en cisplatine en interagissant avec la voie PI3K/AKT/mTOR, en favorisant l'expression de ABCB1 *via* la β -caténine et en augmentant l'efflux du cisplatine. MUC1-C favorise l'expression de système de compensation des ROS induit par le cisplatine, tel que xCT (x-cystéine/glutamate transporter) et le GSH. Le ciblage de MUC1-C diminue ces phénomènes et permet de lutter contre la résistance (Figure 32) (Shigeta *et al.*, 2020). MUC1 induit, également, la résistance au paclitaxel en augmentant l'expression de ABCB1, en induisant l'activation de EGFR et en formant un complexe avec, qui sera transloqué au noyau. Le complexe MUC1-C/EGFR interagit avec 3 domaines du promoteur ABCB1, induisant sa transcription (Figure 32) (Jin *et al.*, 2017).

Le rôle de MUC1-C dans la chimiorésistance est prépondérant, mais il ne faut pas négliger MUC1-N. En effet, des travaux récents datant de 2022, montrent que MUC1-N joue un rôle dans la résistance au paclitaxel, au 5-fluorouracil, au cisplatine et à la doxorubicine, en modulant la perméabilité membranaire. En effet, des études d'absorption ont montré une diminution de l'accumulation du paclitaxel, indépendamment d'ABCB1. MUC1-N augmente le volume d'eau adhérent aux cellules, formant une couche hydrophile limitant l'entrée de composés liposolubles (Figure 34) (Miyazaki *et al.*, 2023).

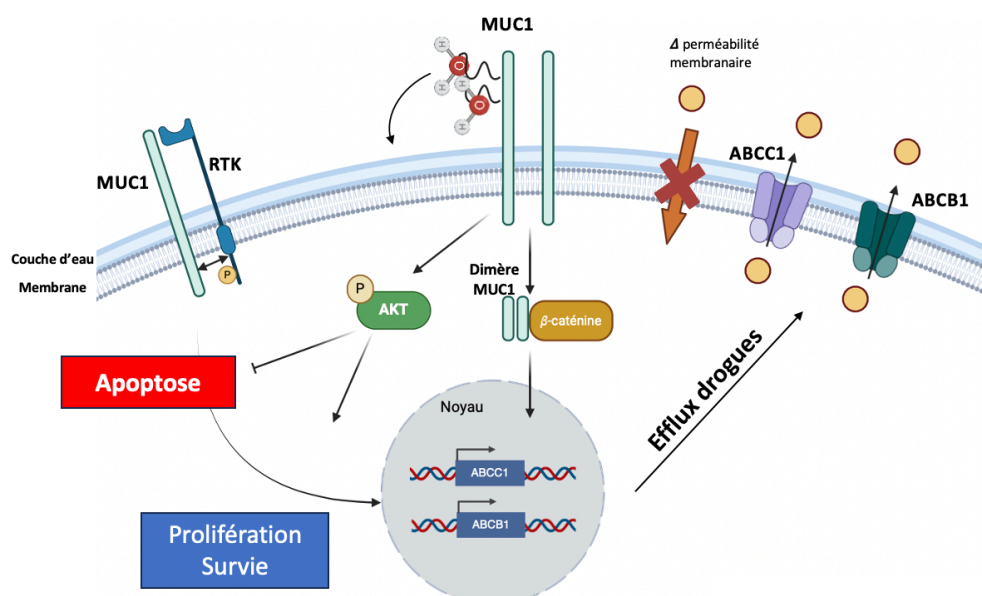


Figure 32 : Représentation schématique de l'ensemble des mécanismes médiés par MUC1 empêchant l'accumulation intracellulaire des thérapies anticancéreuses et induisant la résistance, d'après Nath *et al.*, 2013 ; Shigeta *et al.*, 2020 ; Jin *et al.*, 2017 ; Miyazaki *et al.*, 2022. RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase ; AKT : Protein Kinase B ; ABCC1 : ATP Binding Cassette C1 ; ABCB1 : ATP Binding Cassette B1.

b) Reprogrammation du métabolisme.

La reprogrammation métabolique permet aux cellules cancéreuses de s'adapter aux conditions adverses du milieu dans lequel elles se trouvent, afin de proliférer de manière accrue mais aussi de surmonter le stress induit par la chimiothérapie. Une étude dans l'adénocarcinome pancréatique, montre que l'expression de MUC1 est augmentée en condition hypoxique, favorisant l'absorption de glucose, la voie glycolytique aérobie, l'activation de voies pro-survie et de prolifération ainsi que l'inhibition de l'apoptose. Tous ces éléments favorisent alors la résistance à la gemcitabine (Gebregiworgis *et al.*, 2017).

c) Évitement de l'apoptose induite ou non par les dommages à l'ADN.

L'évitement de l'apoptose peut se faire selon différents mécanismes. En effet, en se liant avec la Gal3 au niveau extracellulaire, MUC1 interagit avec l'EGFR, ce qui induit l'activation des voies de signalisation associées dont MAPK et PI3K/AKT, impliquées dans la prolifération et l'inhibition de l'apoptose, et ceci malgré un traitement avec le gefitinib. Le ciblage de MUC1 avec du GO-203 permet de restaurer la sensibilité des cellules au gefitinib (Kharbanda *et al.*, 2014 a). MUC1 est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN induit par les composés anticancéreux, en participant à la reprogrammation épigénétique. Dans le cancer du sein triple négatif, MUC1-C favorise la localisation nucléaire de BMI1 (b-Lymphoma Mo-MLV insertion region 1) et EZH2 (Enhancer of Zest Homolog 2), deux protéines impliquées dans le remodelage chromatinien et nécessaire au recrutement des protéines de la voie DDR (DNA Damage Response). MUC1-C favorise donc le recrutement des voies de réparation de l'ADN et empêche l'apoptose normalement induite par les chimiothérapies. Le ciblage génétique ou pharmacologique de MUC1 bloque sa localisation nucléaire, inhibe le recrutement de protéines de la voie DDR, et contrecarre la résistance en favorisant l'accumulation des dommages à l'ADN (Yamamoto *et al.*, 2019). Enfin, dans le CBNPC, MUC1-C induit la résistance au paclitaxel en diminuant l'expression de Bax et l'activation de la caspase 3, et en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Le ciblage de MUC1-C par un siRNA promeut l'apoptose après un traitement paclitaxel (Xu *et al.*, 2020).

En conclusion, MUC1 intervient dans les “Hallmarks of the cancer” définis par Hanahan (Figure 33) (Hanahan, 2022). L'évolution a permis de développer des mécanismes de défense des épithéliums face aux agressions extérieures. MUC1 en créant un encombrement stérique et en piégeant les micro-organismes pathogènes contribue à cette protection. Elle est également impliquée dans la restauration de l'homéostasie lorsque celle-ci est perturbée, en induisant la réparation de la lésion. Néanmoins, les voies activées pour réparer ces lésions, comme la TEM (Rajabi et Kufe., 2017), la perte de polarité cellulaire (Alam *et al.*, 2016) et la reprogrammation épigénétique (Rajabi *et al.*, 2018), sont détournées par les cellules cancéreuses au profit de la prolifération et de la dissémination. *Via* ces mécanismes, MUC1 favorise la synthèse de facteurs de pluripotence, le remodelage de la chromatine mais aussi la différenciation cellulaire (Jin *et al.*, 2022). Ces différentes réponses, si elles sont activées de manière prolongée, engendrent une inflammation chronique favorable à la progression tumorale (Cascio et Finn., 2016), à l'évasion immunitaire (Bouillez *et al.*, 2017 a et b) mais aussi à la résistance aux différentes thérapies. Compte tenu de tous ces éléments, MUC1 représente donc une cible thérapeutique potentiellement intéressante.

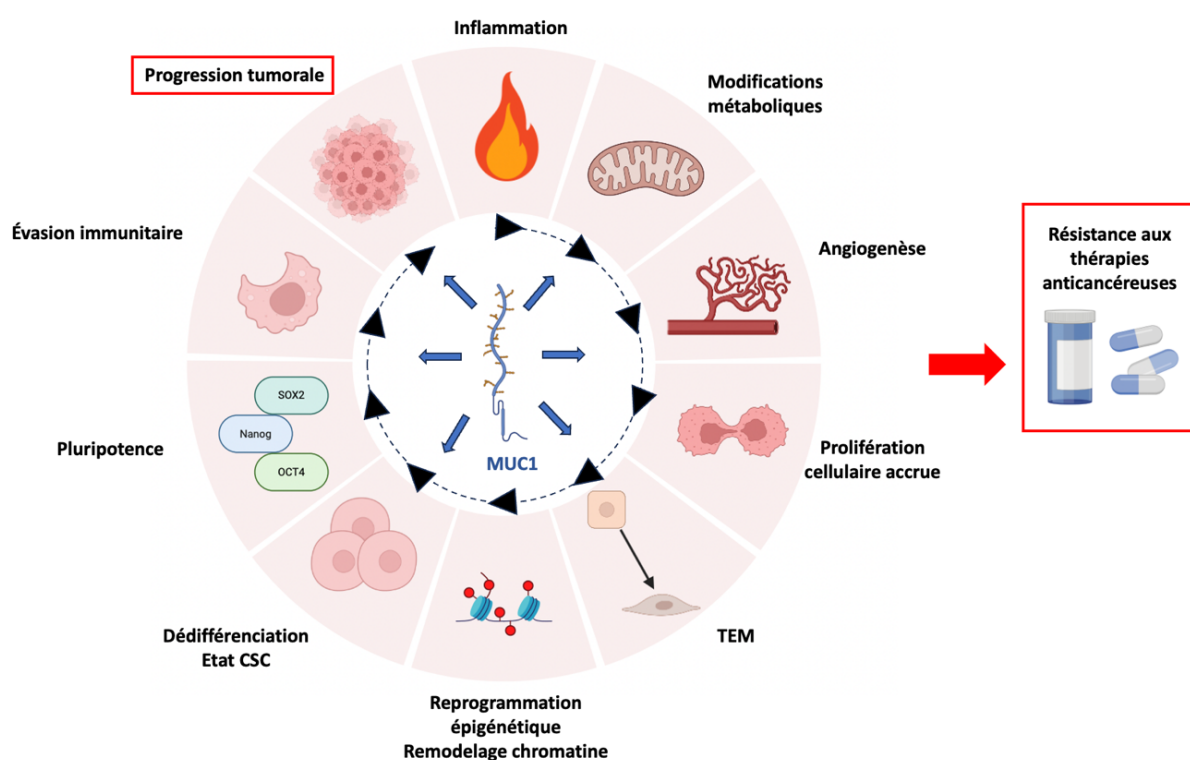


Figure 33 : MUC1 interfère avec tous les « Hallmarks of cancer », d'après Kufe, 2020 et Hanahan, 2022. CSC : Cellule Souche Cancéreuse ; TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse.

VII. Les stratégies thérapeutiques ciblant MUC1.

De par sa localisation, ses fonctions dans la progression tumorale et dans la résistance aux traitements anti-cancéreux mais aussi sa surexpression dans 2/3 des carcinomes humains, MUC1 a été définie comme une cible thérapeutique très attractive, au cours de ces trente dernières années. Selon le « National Cancer Institute », MUC1 est la 2^{ème} meilleure cible potentielle sur 75 antigènes associés aux tumeurs, pour le développement de thérapies contre le cancer. Néanmoins, bien que largement étudié, le ciblage de MUC1 reste complexe (Kufe., 2009 ; Tong *et al.*, 2024).

1) MUC1 comme biomarqueur des cancers :

MUC1 est surexprimée dans le cytosol mais aussi à la surface des cellules. Elle se compose de 2 sous-unités liées de façon non covalente : MUC1-N et MUC1-C. L'action de sheddases permet de cliver la partie extracellulaire et de la relarguer dans le micro-environnement (Nath et Mukherjee., 2014). MUC1-N ainsi relarguée est donc détectable dans le sérum des patients *via* des tests de détections sérique utilisant des anticorps spécifiques (exemple : test sérique CASA). Différents anticorps reconnaissant MUC1 associée au cancer sont commercialisés, dont le CA15.3 qui reconnaît l'épitope DTRPAP des glycosylations aberrantes de MUC1 ou encore le CA19.9 qui reconnaît les motifs glycaniques sialylés de MUC1 associée au cancer (Apostolopoulos *et al.*, 2015).

De par sa surexpression dans de nombreux carcinomes humains, son rôle dans la progression tumorale et la résistance aux thérapies ainsi que son accessibilité sérique, MUC1 est définie comme un marqueur pronostic et diagnostique, dans de nombreux cancers dont le cancer du sein (Atta Manu *et al.*, 2020), les cancers gastro-intestinaux et le CBPNC (Xu *et al.*, 2015).

2) Les stratégies anticorps :

a) Les anticorps ciblant MUC1-N.

MUC1 est exprimée à la surface cellulaire, ce qui rend potentiellement ciblable sa partie extracellulaire. En effet, MUC1-N associée au cancer présente des glycosylations tronquées démasquant des épitopes ciblables. L'une des stratégies de ciblage envisagée est donc le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre des motifs glycaniques avortés (Tong *et al.*, 2024). A titre d'exemple, PankoMab-Gex, aussi appelé Gatipotuzumab, est un anticorps humanisé et

glyco-optimisé qui reconnaît les épitopes tronqués de MUC1 associée au cancer, comportant un antigène Tn, afin de générer une forte immunogénicité et permettre la destruction de la cible par les cellules NK (Natural Killer). Des résultats prometteurs ont été obtenus lors d'un essai clinique de phase I dans le CBNPC, où une activité antitumorale a été induite par le PankoMab-Gex (NCT01222624 sur clinicaltrials.gov) (Figure 34A) (Fiedler *et al.*, 2016). Néanmoins, dans un essai clinique de phase II (NCT01899599 sur clinicaltrials.gov) dans le cancer de l'ovaire, le PankoMab-Gex ne montre pas d'amélioration dans la prise en charge des patientes, en comparaison avec un placebo, faisant de lui un candidat malheureux (Ledermann *et al.*, 2022). TAB004 est un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement MUC1-N associée au cancer et ne reconnaît pas MUC1-N exprimée par des cellules normales. Dans le cancer du pancréas, l'utilisation de cet anticorps limite la formation de colonies et inhibe la résistance à l'anoïkis (Figure 34A) (Bose *et al.*, 2023).

L'utilisation des anticorps anti-MUC1-N présente une limite de taille. En effet, MUC1-N clivée est relarguée dans le milieu extracellulaire après clivage et est détectée dans le sérum des patients. Ce pool de MUC1 représente donc une barrière à la délivrance des anticorps monoclonaux, car ceci, sont généralement administrés par voie intraveineuse. Ils vont, alors, interagir avec MUC1-N sérique, ce qui conduit à un épuisement des anticorps disponibles arrivant à la surface cellulaire, diminuant ainsi l'immunogénicité normalement induite (Tong *et al.*, 2024).

b) Les anticorps ciblant MUC1-C.

Après clivage de MUC1-N, MUC1-C reste à la membrane. MUC1-C est largement connue pour ses fonctions oncogéniques et représente une cible d'intérêt. Afin de la cibler et d'empêcher son action au sein du noyau, des anticorps monoclonaux ciblant la partie extracellulaire de MUC1-C ont été développés. Une équipe coréenne a développé un anticorps monoclonal appelé anti-hMUC1. En ciblant MUC1-C, il inhibe la phosphorylation de l'EGFR médiée par MUC1, ainsi que l'expression de *CCDN1*, diminuant la prolifération et la progression tumorale dans le cancer du pancréas et du sein (Figure 34A) (Wu *et al.*, 2018 a ; Wu *et al.*, 2018 b).

c) Les complexes drogue/anticorps.

Le développement des anticorps contre MUC1 a permis l'essor de nouvelles techniques de ciblage, dont les ADCs (Antibody-drug conjugate) font partie. Les ADCs sont des complexes couplant un anticorps ciblant spécifiquement MUC1 et un médicament anticancéreux, allant du perturbateur des microtubules aux agents alkylants. La haute affinité de l'anticorps permet la reconnaissance spécifique

de MUC1 et la drogue sera endocytée (Jin *et al.*, 2022). Un ADC prometteur est l'ADC mAb3D1-MMAE. Il couple un anticorps humanisé de MUC1 (hzMUC1), qui reconnaît spécifiquement MUC1 associée à la surface des cellules tumorales, couplé à la MMAE (monométhyl auristatine E), un agent perturbateur des microtubules. Les premières études sur des souris xénogreffées avec des cellules de CBNPC, montre une activité anti-tumorale (Figure 34A) (Panchamoorthy *et al.*, 2018). A ce jour, en 2024, 13 ADCs ont obtenus une approbation par la FDA, un essai clinique est en cours dans le CBNPC (NCT04695847 sur clinicaltrials.gov) et les études fondamentales sont en plein essor.

d) Les BiTEs (*Bi-specific T-cell engager*).

Les BiTEs sont une nouvelle stratégie thérapeutique émergente depuis quelques années. Ils présentent la particularité de combiner deux anticorps monoclonaux ayant respectivement une spécificité chacun : un anticorps cible spécifiquement un élément conservé du système immunitaire (généralement le CD3 des lymphocytes T) et l'autre anticorps possède une affinité accrue pour une cible définie, dans notre cas MUC1. Ils sont produits par fusion chimique de deux anticorps ou par fusion de deux lignées cellulaires productrices d'anticorps monoclonaux différents (Lampe *et al.*, 2024). Plusieurs BiTEs sont actuellement en cours d'essais pré-cliniques afin de cibler les cellules exprimant MUC1 associée au cancer. PM-CD3-GEX est un BiTEs couplant PankoMab (anticorps ciblant spécifiquement MUC1 associée au cancer) et CD3, actuellement en phase d'essai pré-clinique dans le CBNPC. Il permet le recrutement des lymphocytes T CD3+ cytotoxiques au niveau des cellules positives pour MUC1, afin d'induire leur destruction (Figure 34A) (Lee *et al.*, 2021). Aujourd'hui, des équipes tentent même de produire des TriTEs, dans lesquels seront combinés 3 anticorps (Zarezadeh Mehrabadi *et al.*, 2024).

3) Les vaccins :

MUC1 est exprimée à la surface cellulaire. Sa partie extracellulaire largement étendue au-dessus de la surface cellulaire, la rend accessible aux effecteurs de la réponse immunitaire impliquée dans les vaccins. Comme MUC1 est exprimée de manière ubiquitaire, les vaccins développés cherchent à viser les glycosylations aberrantes de MUC1 associée au cancer, afin de ne pas cibler MUC1 des cellules normales. A ce jour, 76 essais cliniques portant sur le ciblage de MUC1 par des vaccins sont en cours ou terminés. Ces différentes études rapportent que ces vaccins sont capables d'induire une réponse immunitaire humorale avec production d'anticorps dirigés contre MUC1 associée au cancer suivi d'une réponse immunitaire cellulaire (Kufe., 2020). Les vaccins développés reposent sur

différentes stratégies : vaccins à sous unités, vaccin à ARN, vaccin à ADN, vaccin à DC (Dendritic Cell) ou encore vaccins à glycopeptidiques (Tong *et al.*, 2024).

a) Les vaccins à sous unités.

Les vaccins à sous unités repose sur l'utilisation d'épitopes du domaine VNTR de MUC1, associés à des agonistes immunitaires. C'est le cas du Tecemotide (L-BLP25), où un fragment de 25 aa du domaine VNTR est inclus dans un liposome avec un agoniste de TLR4 (Tool Like Receptor 4) (Figure 34B). Des essais cliniques de phase II montrent que ce vaccin induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire, et une potentielle efficacité clinique dans le cancer du sein (Singer *et al.*, 2020).

b) Les vaccins à ARN.

Les vaccins à ARN sont en plein essor car ils présentent de nombreux avantages, dont celui d'induire des réponses immunitaires plus fortes que les vaccins à ADN (Kramps et Elbers., 2017). Des essais *in vitro*, couplant un ARNm de MUC1 à des nanoparticules, engendrent une puissante réponse médiée par les lymphocytes T (Liu *et al.*, 2018).

c) Les vaccins à ADN.

Les vaccins à ADN sont largement reconnus pour leur efficacité et leur sécurité. Le TG4010 est un vaccin à vecteur viral exprimant MUC1 FL (Full Length) à 5 TR et l'IL-2, utilisé dans plusieurs types de cancer (Figure 34B). Des essais cliniques de phase II montrent que les meilleures réponses ont lieu dans le cancer du poumon, en allongeant la durée de vie sans progression, quand il est combiné à de la chimiothérapie (Quoix *et al.*, 2016 ; Tosch *et al.*, 2017). L'efficacité des vaccins dépend de leur absorption par les cellules dendritiques. Ainsi, des vaccins utilisant les cellules dendritiques comme vecteurs sont également en phase d'essais cliniques. Des essais de phase I et II montrent leur capacité à induire une réponse immunitaire puissante, leur sécurité et leur efficacité, dans le CBNPC (Ge *et al.*, 2017). Néanmoins, à ce jour et malgré leur efficacité, ces vaccins ne sont pas encore entrés en essais cliniques de phase III.

d) Les vaccins à glycopeptides.

La glycosylation aberrante de la partie extracellulaire de MUC1 associée au cancer représente une cible attractive. Cependant, les glycopeptides naturels ne sont pas suffisants pour induire la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps. C'est la raison pour laquelle, différentes équipes cherchent à produire des glycopeptides de synthèses et à les associer à des stimulants immunitaires (Cai *et al.*, 2013).

4) Les CAR-X cells :

Les avancées en génie génétique et dans la compréhension de l'immunologie fondamentale ont permis de développer de nouvelles stratégies pour cibler des antigènes spécifiques de tumeurs, dont MUC1 fait partie. Parmi ces nouvelles stratégies, on peut citer les CAR-T cells (Chimeric Antigen Receptor-T) et les CAR-NK cells (Chimeric Antigen Receptor- NK), dont l'objectif est de reconnaître les cellules cancéreuses exprimant leur cible spécifique et de les détruire directement.

a) Les CAR-T cells.

Ce protocole repose sur la rééducation des lymphocytes T d'un patient. Après avoir été collectés à partir du sang, les lymphocytes T sont « reprogrammés » en laboratoire afin de produire à leur surface des récepteurs chimériques de l'antigène (ou CAR) puis réinjectés au patient. Une fois réinjectés, ils vont continuer à proliférer et seront aptes à reconnaître leur antigène de prédilection exprimé par les cellules cancéreuses, dans notre cas MUC1, et tout ceci indépendamment du CMH que les cellules cancéreuses sont capables de modifier pour échapper au système immunitaire.

Les CAR-T cells se composent de 4 parties : un domaine extracellulaire de reconnaissance de l'antigène, dérivant d'un anticorps monoclonal ; un domaine transmembranaire permettant l'ancrage et dérivant de CD8, CD3- ζ ou OX40 ; un domaine de signalisation intracellulaire comprenant un domaine d'activation unique et des motifs ITAM (généralement une chaîne du complexe TCR) et/ou un domaine de costimulation (CD28, CD27). Après modification et amplification en laboratoire, les CAR-T cells réinjectés vont reconnaître leur antigène cible associé à la tumeur et permettre la libération de perforine et d'un éventail de cytokines permettant la mise en place d'une réponse immunitaire puissante (Figure 34A). Ces CAR-T cells ont montré leur efficacité dans les cancers du sang exprimant CD19 mais aujourd'hui des équipes essaient de les appliquer à d'autres cancers (Srivastava et Riddell., 2015 ; Mei *et al.*, 2020). Au cours d'étude pré-cliniques, l'équipe du Dr. Zhang a synthétisé un CAR-T cell

reconnaissant MUC1 associée au cancer, capable de libérer de l'IL-22 pour amplifier la réponse immunitaire induite. Les résultats obtenus montrent que ce complexe chimérique participe à l'immunité antitumorale en induisant une cytotoxicité accrue, tuant directement les cellules cancéreuses exprimant MUC1 (Mei *et al.*, 2020). Plusieurs essais cliniques de phase I et II sont actuellement en cours dans le CBNPC, avec des CAR-T cells ciblant les chaînes oligosaccharidiques tronquées de MUC1 associée au cancer (NCT04025216 et NCT05239143 sur clinicaltrials.gov).

b) Les CAR-NK cells.

De manière plus récente, des équipes de recherches se sont intéressées au développement de CAR-NK cells, car les cellules NK (Natural Killer) sont des bons véhicules pour les récepteurs chimériques d'antigènes. Le principe de fonctionnement est le même : les NK issus du sang du patient sont modifiés en laboratoire pour exprimer un récepteur chimérique de l'antigène souhaité, puis après amplification sont réinjectés au patient. ONKT-103 est un CAR-NK cell ciblant MUC1, qui a pour particularité de maximiser la réponse antitumorale induite, après reconnaissance de l'antigène, par activation de la voie des récepteurs de mort médiée par TRAIL. Ce CAR-NK est actuellement en phase d'essai pré-clinique dans différents cancers, dont celui du poumon (Figure 34A) (Lee *et al.*, 2021). L'utilisation de CAR-NK cells ciblant les cellules cancéreuses MUC1 + a été testé dans le cancer de la langue. Les CAR-NK cells générés montrent une forte cytotoxicité face aux cellules exprimant MUC1 dans un modèle préclinique murin (Lin *et al.*, 2024). Un essai clinique est actuellement cours dans les cancers solides réfractaires aux traitements (NCT02839954 sur clinicaltrials.gov).

5) Les peptides inhibiteurs :

La queue cytoplasmique de MUC1 est responsable de l'essentiel de sa fonction oncogénique et représente donc une cible intéressante. L'équipe du Dr. Kufe a caractérisé cette queue cytoplasmique et a relevé le rôle important du motif CQC hautement conservé au sein de la séquence CQCRRK, en position juxtamembranaire, pour l'homodimérisation et la translocation nucléaire de MUC1-C. Cette séquence, *via* ses résidus cystéines, permet la formation de ponts disulfures avec d'autres résidus cystéines. Ils ont donc défini cette séquence comme cible potentielle et ont développé un peptide susceptible de former des ponts disulfures avec ces résidus cystéine, appelé GO-203 (Raina *et al.*, 2015). Le GO-203 contient la séquence endogène CQCRRKN liée à 9 résidus asparagine en position N-terminale, ce qui lui confère la capacité de passer la membrane plasmique et de se lier au motif CQC du MUC1-C, bloquant son homodimérisation et sa translocation nucléaire (Figure 34C). Ce peptide

inhibiteur peut aussi être internalisé dans des nanoparticules pour faciliter le passage membranaire (Hasegawa *et al.*, 2015). Les résultats encourageants obtenus *in vitro* et *in vivo*, ont été confirmé au cours d'essais cliniques de phase I (NCT02204085 sur clinicaltrials.gov).

6) Les aptamères :

Introduit pour la première fois dans les années 1990, les aptamères (aussi connus sous le nom d'anticorps chimiques ou synthétiques) sont des composés synthétiques capable de se lier spécifiquement à une cible. Ils sont de 2 types et on distingue les aptamères oligonucléotidiques, des aptamères peptidiques. Les aptamères oligonucléotidiques sont de courtes séquences ADN ou ARN de 20 à 100 paires de bases, capables d'interagir spécifiquement et avec une haute affinité, avec des ligands particuliers. Les aptamères peptidiques sont de courts peptides de 5 à 20 acides aminés (Alhamhoom *et al.*, 2022). Les aptamères sont générés *via* le mécanisme cyclique SELEX (Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), qui se divise en plusieurs étapes clés. La première étape permet de lier la cible. Pour cela, la molécule cible est incubée avec une bibliothèque aléatoire ou un pool d'oligonucléotides. Au cours de la deuxième étape, les séquences liées sont isolées de la cible. Ces séquences isolées sont, ensuite, amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction), afin de générer un pool d'ADN/ARN à ré-utiliser (Nabavinia *et al.*, 2017). Les aptamères présentent de nombreux avantages par rapport aux anticorps « classiques ». Au-delà de leur haute affinité et spécificité, comme ce sont des molécules synthétiques, il est facile de les modifier en enlevant ou en ajoutant des groupements, afin d'améliorer leur spécificité pour leur cible par exemple. De plus, ils sont bon marché et sont rapidement produits. Enfin leur petite taille représente un atout non négligeable. Ils peuvent également être associé à des molécules de chimiothérapie, afin d'induire la mort des cellules cancéreuses. Le premier aptamère ayant pour cible MUC1 a été synthétisé en 2005 et ciblait la totalité de MUC1 (Missailidis *et al.*, 2005). L'année suivante, des aptamères ayant pour cible spécifique MUC1 associée au cancer ont été développés, de manière à reconnaître les épitopes hautement immunogéniques du VNTR de MUC1 (Ferreira *et al.*, 2006). Depuis ce jour, d'autres aptamères ont été mis au point, mais le dernier aptamère développé ayant pour cible le domaine VNTR de MUC1 associé au cancer est l'aptamère ADN MA3 (Figure 34C). Testé au sein de deux lignées cancéreuses, les résultats obtenus montrent qu'il cible exclusivement les cellules positives à MUC1 associée au cancer (Hu *et al.*, 2012). De cette base, ont émergé de nombreux dérivés : conjugaison d'aptamère avec des chimiothérapies telle que la doxorubicine (Hu *et al.*, 2012), conjugaison d'aptamère et des nanoparticules en tout genre dont l'acide polylactique-coglycolique pour améliorer la capacité d'administration de traitements anticancéreux (Lee *et al.*, 2022), conjugaison aptamères et de

nanocarriers ADN, conjugaison d'aptamère et de nanoparticules d'oxyde de fer etc... (Nabavinia *et al.*, 2017). Les possibilités de conjugaison sont nombreuses et variées, faisant des aptamères une stratégie thérapeutique intéressante. Aujourd'hui, seulement 2 aptamères ont obtenus une approbation par la FDA et aucun essai clinique n'est en cours dans le cancer (source clinicaltrials.gov).

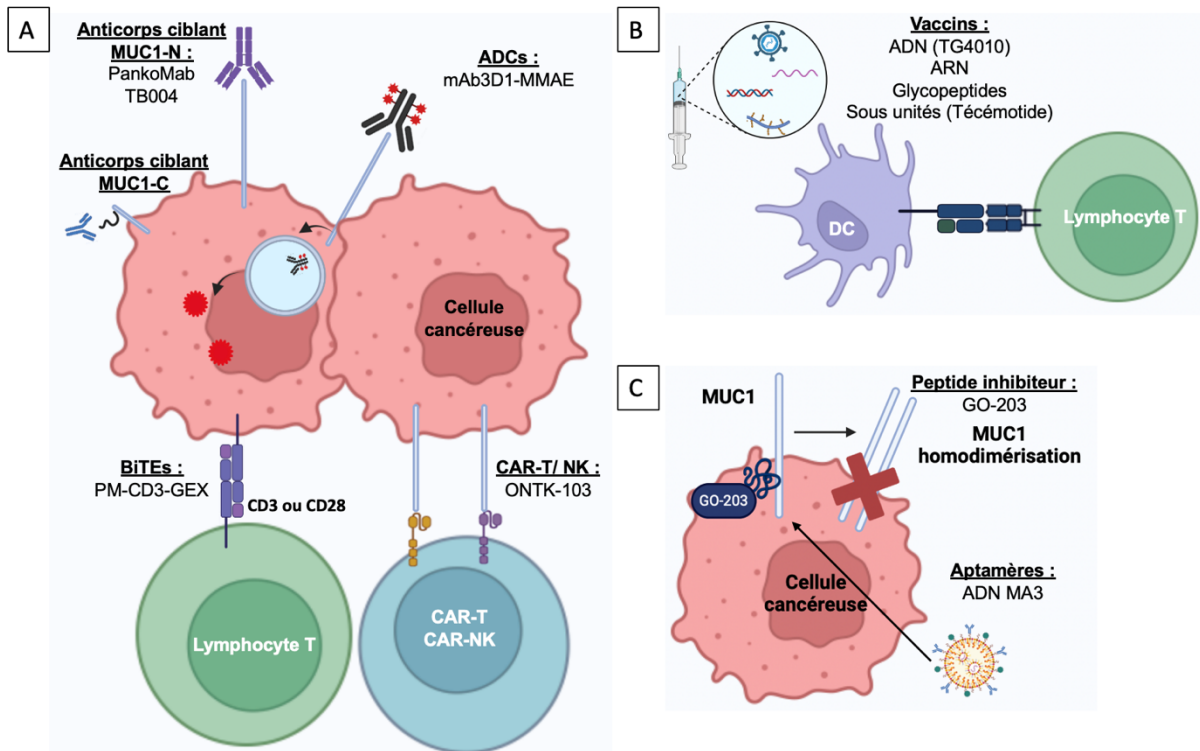


Figure 34 : Ensemble des stratégies thérapeutiques ciblant MUC1, d'après Lee *et al.*, 2021. **A)** Le domaine extracellulaire de MUC1 est une cible thérapeutique potentielle pour les anticorps monoclonaux ciblant MUC1-N mais aussi MUC1-C. Les ADCs permettent de délivrer des substances anti-cancéreuses à l'intérieur des cellules après reconnaissance spécifique de MUC1. Les BiTEs résultent de l'association de 2 anticorps spécifiques et permettent le recrutement des lymphocytes T cytotoxiques CD3, afin d'éliminer les cellules cancéreuses exprimant MUC1. Les CAR-T/NK cells, après reconnaissance de MUC1 sur les cellules cancéreuses, induisent leur élimination directe. **B)** Les vaccins permettent d'induire une réponse immunitaire face aux cellules exprimant MUC1. **C)** Le peptide inhibiteur GO-203 empêche l'homodimérisation de MUC1 ainsi que sa translocation nucléaire. Les aptamères sont de nouvelles stratégies prometteuses pour le ciblage de MUC1.

VIII. MUC1 et cancer du poumon.

MUC1 est sur-exprimée dans plus de 80% des adénocarcinomes pulmonaires, le sous type histologique majeur des CBNPCs (Tableau 3) (Buyuk *et al.*, 2023). Des analyses histologiques montrent que la surexpression de MUC1 est associée à un mauvais pronostic, induisant une diminution de la survie globale et une diminution de la survie sans progression (Huang *et al.*, 2017). Des analyses multivariées ont permis de définir MUC1 comme un facteur pronostic dans les CBNPCs, car son expression est positivement corrélée au stade de la tumeur (Situ *et al.*, 2011).

L'exposition à des facteurs extérieurs tel que la fumée issue de la combustion du tabac induit l'expression de MUC1 et favorise ainsi le développement d'adénocarcinome. En effet, des études *in vitro* et *in vivo*, au cours desquelles des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires ont été exposées des fumées tabagiques, montrent une augmentation d'expression de MUC1 (Lappi-Blanco *et al.*, 2016).

Modèles histologiques d'adénocarcinomes pulmonaires (n=193)	Acinaire (n=71)	Lépidique (n=30)	Papillaire (n=25)	Micro-papillaire (n=20)	Solide (n=34)	Mucineux (n=13)
MUC1 +	61 (85%)	27 (90%)	21 (84%)	17 (85%)	30 (88,2%)	7 (53,8%)

Tableau 3 : Proportion de tumeurs positives à MUC1 en fonction des différents sous types d'adénocarcinomes pulmonaires, d'après Buyuk *et al.*, 2023. Analyse histologique de 193 tissus issus de patients, permettant de distinguer les proportions des différents sous types d'adénocarcinomes pulmonaires mais aussi le pourcentage de tumeurs positives à l'expression de MUC1. Au total, plus de 80% des tumeurs d'adénocarcinomes étudiées sont positive à MUC1 (84,4%).

Différentes études montrent que MUC1 joue un rôle dans la tumorigénèse pulmonaire. MUC1 intervient dans l'évasion immunitaire, en induisant l'expression de PD-L1 (Bouillez *et al.*, 2017 a et b), en modulant le phénotype des macrophages et en favorisant l'accumulation de TAMs (Huang *et al.*, 2016), et en diminuant l'accumulation de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ dans le microenvironnement tumoral (Jiang *et al.*, 2020). MUC1 est impliquée dans la progression tumorale, car elle induit la TEM (Kharbanda *et al.*, 2014 b), favorise la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose (Xu *et al.*, 2017), permet la création d'un micro-environnement inflammatoire prolongé par production d'IL-6 *via* les voies NF- κ B et MAPK (Xu *et al.*, 2024) et enfin intervient dans la formation des métastases en induisant l'invasion (Gao *et al.*, 2009). Enfin, MUC1 est une actrice clé de la résistance aux thérapies dans le CBNPC. Elle induit la résistance au paclitaxel (Ham *et al.*, 2016), mais aussi la résistance à l'erlotinib (Jin *et al.*, 2017) et à l'osimertinib (Haratake *et al.*, 2024).

IX. Objectif du projet et travaux personnels :

Malgré les avancées dans le diagnostic et la prise en charge du cancer du poumon, ce dernier reste la première cause de mortalité par cancer dans le monde et son pronostic est sombre. La meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques, la découverte des « drivers oncogéniques » et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ont révolutionné la prise en charge des cancers bronchiques. Néanmoins, la chimiothérapie cytotoxique à base de sels de platine, comme le cisplatine, demeurent un des traitements de référence du CBNPC et ceci quel que soit le stade. En dépit de l'efficacité reconnue du cisplatine dans la prise en charge des cancers, son utilisation reste limitée puisqu'il induit des problèmes de résistance. MUC1, une mucine transmembranaire, connue pour ses rôles dans la progression tumorale et dans la résistance pour de nombreuses thérapies, représente une cible potentiellement intéressante, d'autant plus qu'elle est surexprimée dans de nombreux cancers, dont celui du poumon.

Lors d'études préliminaires menées au sein de notre équipe qui travaille sur MUC1 et son rôle en pathologie cancéreuse ou non depuis des années, le ciblage de MUC1 par un siRNA dans 3 lignées différentes d'adénocarcinomes pulmonaires a permis de sensibiliser les cellules au cisplatine, révélant son potentiel rôle dans l'acquisition de la résistance innée au cisplatine dans le cancer du poumon (Figure 35B).

Partant de ces observations et sachant que MUC1 est surexprimée dans de nombreuses lignées cancéreuses pulmonaires (Figure 35A), les objectifs de mon projet de thèse sont :

- 1) Confirmer le rôle de MUC1 dans la progression tumorale dans le CBNPC.**
- 2) Confirmer le rôle de MUC1 dans l'acquisition de la résistance au cisplatine dans le CBNPC.**
- 3) Définir MUC1 comme une nouvelle cible thérapeutique, en utilisant une thérapie innovante, que sont les ASO (Antisense Oligonucleotid) de type GapmeR.**

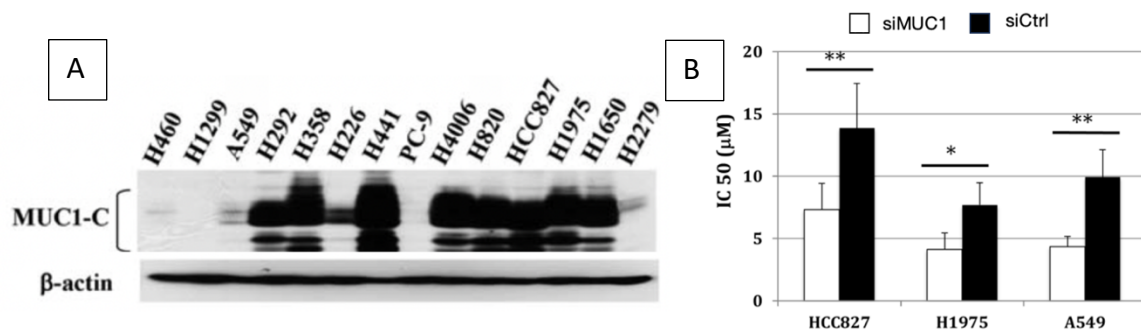


Figure 35 : Données préliminaires. A) Expression de MUC1-C au sein de différentes lignées d'adénocarcinomes pulmonaires, d'après Gao *et al.*, 2009. PC9 est l'une des rares lignées cancéreuses pulmonaires à ne pas exprimer MUC1. **B)** Les cellules HCC827, H1975 et A549 sont 3 lignées d'adénocarcinomes pulmonaires exprimant MUC1, qui ont été transfectées soit par un siRNA contrôle (siCtrl) soit pour un siRNA ciblant MUC1 (siMUC1). Par la suite, elles ont été traitées avec des doses croissantes de cisplatine, afin de déterminer l'IC₅₀ au cisplatine respective à chaque lignée. *p<0,05 ; **p<0,01.

RÉSULTATS

X. Résultats :

Partie 1 : Rôle de MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires.

1) Validation des modèles cellulaires.

Dans ce projet, afin de mieux comprendre le rôle de MUC1 dans le CBNPC, cinq lignées d'adénocarcinomes pulmonaires sont utilisées : la lignée cellulaire PC9 qui présente la particularité de ne pas exprimer MUC1 et les lignées cellulaires H1975, HCC827, H292 et A549 qui expriment toutes MUC1. La stratégie employée a été de générer des clones sur-exprimant de manière stable MUC1 pleine longueur (MUC1-FL) et des clones invalidés pour l'expression de MUC1. Pour cela, les cellules PC9 ont été transfectées de manière à surexprimer stablement MUC1-FL et les cellules H1975, HCC827, H292 et A549 ont été rendues KO pour l'expression de MUC1 par une technique CRISPR/Cas9. La première étape a été de valider nos différents modèles cellulaires, en vérifiant l'expression de MUC1 par western blot (Figure 36) mais aussi par immunofluorescence (Figure S1). Le clone PC9 transfecté avec le vecteur vide (PC9-) ne présente pas d'expression de MUC1, alors que celui transfecté avec le plasmide MUC1-FL (PC9+) présente une forte expression de MUC1. A l'inverse, dans les cellules H1975, HCC827, H292 et A549, le clone parental exprime MUC1 et celui modifié par CRISPR/Cas9 voit son expression de MUC1 fortement diminuée (de 63 à 98% d'inhibition suivant la lignée cellulaire) (Figure 36). Les résultats obtenus par western blot ont été confirmés par immunofluorescence de MUC1 (Figure S1).

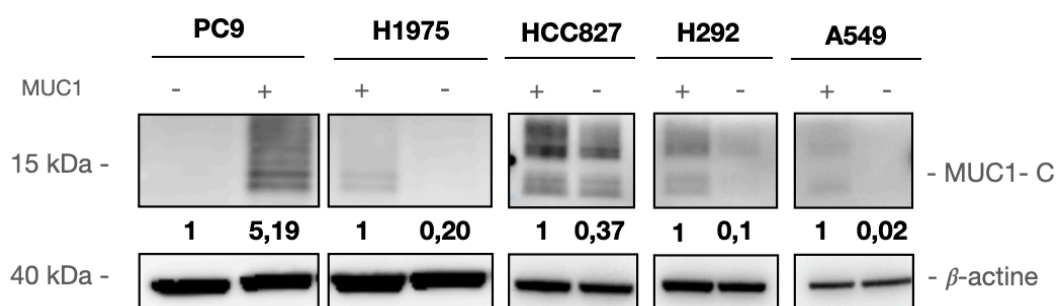


Figure 36 : Validation des modèles cellulaires après vérification de l'expression de MUC1.

L'expression de MUC1-C a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge ainsi que pour la quantification, *via* le logiciel ImageJ.

2) Rôle de MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires.

Après validation de nos différents modèles cellulaires, le rôle de MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires a été étudié et plus précisément son rôle sur la prolifération, la survie, la migration, l'invasion, la capacité à former des clones et l'apoptose.

a) *MUC1 et prolifération cellulaire.*

La prolifération a été suivie par l'intermédiaire d'un comptage sur cellule de Malassez toutes les 24h pendant 4 jours (Figure 37A, B, C), par suivi de la confluence d'un tapis cellulaire *via* la technologie Incucyte® (Figure 37D, E, F), en prenant des photos toutes les 6 heures pendant 4 jours et par un suivi du marquage au Ki-67 par immunofluorescence (Figure 38).

Les résultats obtenus par comptage sur cellule de Malassez montrent que les cellules PC9 transfectées avec MUC1-FL (PC9+) (en rouge) prolifèrent plus rapidement que les cellules PC9 transfectées avec le vecteur vide (PC9-) (en noir) (Figure 37A). Les lignées parentales H1975, HCC827, H292 et A549 exprimant MUC1 prolifèrent, également, plus rapidement que les lignées invalidées pour MUC1 (Figure 37B et C et Figure S2A et B). L'invalidation de MUC1 diminue la prolifération cellulaire et permet de contrecarrer le phénomène.

Des résultats similaires ont été obtenus lors du suivi de la confluence du tapis cellulaire *via* la technologie Incucyte®. Lorsque les cellules PC9 expriment MUC1-FL (PC9+), la confluence à 50% du tapis cellulaire est atteinte plus précocement (60h post-ensemencement) que pour les cellules PC9 transfectées avec le vecteur vide (PC9-) (78h post-ensemencement). Après 96h de suivi de la confluence, le tapis cellulaire des PC9+ est significativement plus confluent que celui des PC9- (80% vs 60% ; $p < 0,001$) (Figure 37D). Pour toutes les lignées d'adénocarcinome pulmonaire exprimant MUC1, la confluence à 50% est atteinte de manière plus précoce que pour les lignées invalidées pour MUC1. En effet, dans les puits ensemencés avec les cellules H1975 exprimant MUC1 (H1975+, en vert), la confluence à 50% est atteinte à 60h contre 72h pour les cellules H1975 KO MUC1 (H1975-, en bleu) ($p < 0,0001$). A 96h, la confluence totale du puit est de 80% pour les H1975+ contre 65% pour les cellules H1975- (Figure 37E) ($p < 0,0001$). Des résultats similaires sont obtenus pour les cellules A549 : la lignée parentale exprimant MUC1 (A549+, en violet) atteint la confluence à 50% 54h après ensemencement, contre 66h pour la lignée A549 KO MUC1 (A549-, en blanc). 96h après ensemencement, la confluence

est atteinte dans le puits contenant les cellules A549+ et n'est que de 78% pour les cellules A549- (Figure 37F) ($p < 0,0001$). Pour les cellules HCC827 exprimant MUC1 (HCC827+), la confluence à 50% du tapis cellulaire est atteinte à 72h alors que la confluence n'est que de 22% au même moment pour les cellules HCC827 invalidées pour MUC1 (HCC827-). A 96h, la confluence du tapis cellulaire formé par les cellules HCC827 est de 78% contre 40% pour les cellules HCC827- ($p < 0,0001$) (Figure S2C). Les cellules H292 exprimant MUC1 (H292+) prolifèrent plus rapidement que les cellules H292 invalidées pour MUC1 (MUC1-), et ceci de manière significative à partir de 48h après le début du suivi ($p < 0,001$). A 96h, la confluence du tapis cellulaire H292+ est de 90% contre 77% pour les cellules H292- ($p < 0,0001$) (Figure S2D).

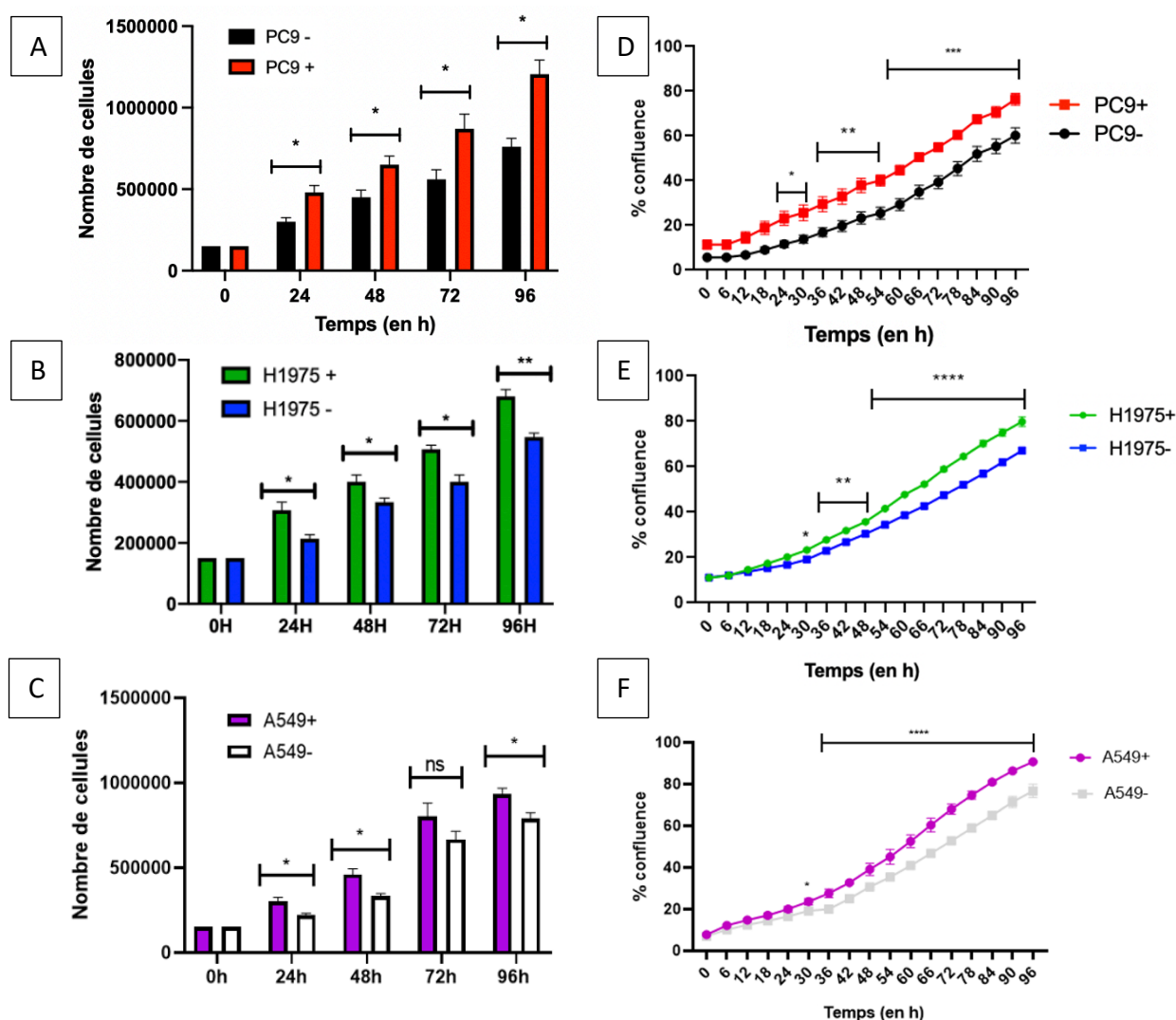


Figure 37 : L'expression de MUC1 favorise la prolifération cellulaire, au sein des différentes lignées d'adénocarcinomes pulmonaires.

Après ensemencement à hauteur de 150 000 cellules par puits, les cellules PC9 (A), H1975 (B) et A549 (C) exprimant ou non MUC1 ont été comptées sur cellule de Malassez toutes les 24h, pendant 4 jours ($n=3$). Après ensemencement à hauteur de 25 000 cellules par puits, la confluence du tapis cellulaire a été suivie par la technologie Incucyte® avec prise de photos toutes les 6 heures pendant 4 jours, pour les cellules PC9 (D), H1975 (E) et A549 (F) ($n=3$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Un suivi du marquage Ki-67, un marqueur de la prolifération particulièrement utilisé dans l'étude des cellules cancéreuses, par immunofluorescence a été effectué sur les différentes lignées. Dans la lignée PC9, la surexpression de MUC1 augmente de manière significative, le nombre de cellules positives au marquage Ki-67 (PC9- : $69,30 \pm 3,295$ vs PC9+ : $80,75\% \pm 2,80$; $p < 0,05$, Figure 38A). L'invalidation de MUC1 par CRISPR/Cas9 au sein des cellules H1975 diminue le nombre de cellules positives au marquage Ki-67 (H1975+ : $77,56\% \pm 2,88$ vs H1975- : $67,48\% \pm 2,615$; $p < 0,05$, Figure 38B). Il n'y a pas de différences significatives du marquage Ki-67 au sein des cellules A549 (A549+ = $83,37 \pm 1,41$ vs A549- = $82,79\% \pm 1,879$; $p = 0,8052$, Figure 38C). L'augmentation du marquage Ki-67 au sein des lignées cellulaires PC9 et H1975 exprimant MUC1 confirme les résultats obtenus par comptage et suivi de confluence du tapis cellulaire. Pour les cellules PC9 et H1975, MUC1 favorise la prolifération cellulaire et son invalidation diminue le phénomène.

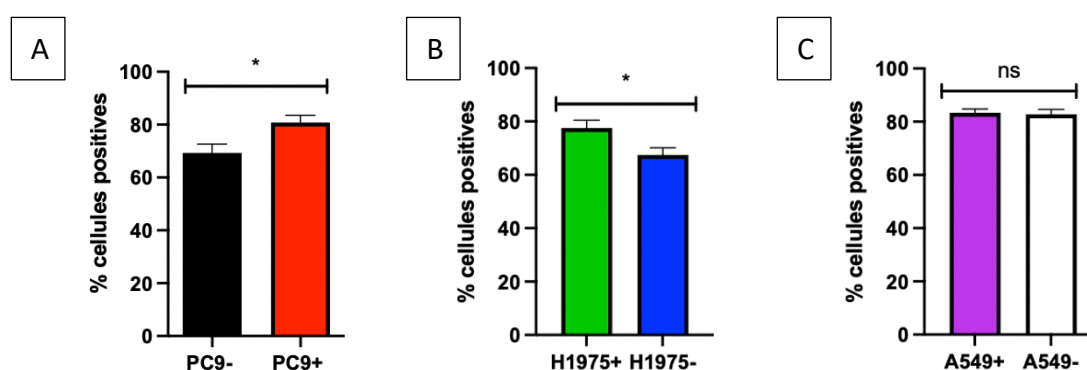


Figure 38 : L'expression de MUC1 dans les lignées PC9 et H1975 favorise le marquage au Ki-67.

Évaluation du pourcentage de cellules positives au marquage Ki-67, par immunofluorescence sur lame au sein des cellules PC9 (A), des cellules H1975 (B) et des cellules A549 (C) (n=3). * $p < 0,05$

Par la suite, sachant que MUC1 est impliquée dans l'activation de diverses voies de signalisation dont les voies MAPK et PI3K/AKT (Kufe, 2009), l'expression de divers intermédiaires de ces voies a été étudiée par western blot (Figure 39). Les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives au niveau de la phosphorylation d'AKT et donc de l'activation de la voie PI3K/AKT. En revanche, l'expression de MUC1 au sein des différentes lignées cellulaires est corrélée avec la phosphorylation de Erk1/2. L'invalidation de MUC1 au sein des lignées H1975 et A549 permet de diminuer cette phosphorylation de 60 à 70%. Ces résultats suggèrent que MUC1 induit l'activation de la voie MAPK et confirment les résultats obtenus précédemment, puisque cette voie est impliquée dans la prolifération cellulaire accrue. L'expression de p21, protéine inhibitrice des CDK2 et CDK4 et impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, a été étudiée. Nous montrons que MUC1 diminue l'expression de p21 et que son invalidation favorise l'accumulation de cette protéine responsable d'un arrêt du cycle cellulaire. Nous confirmons, une nouvelle fois, un rôle de MUC1 dans la prolifération cellulaire.

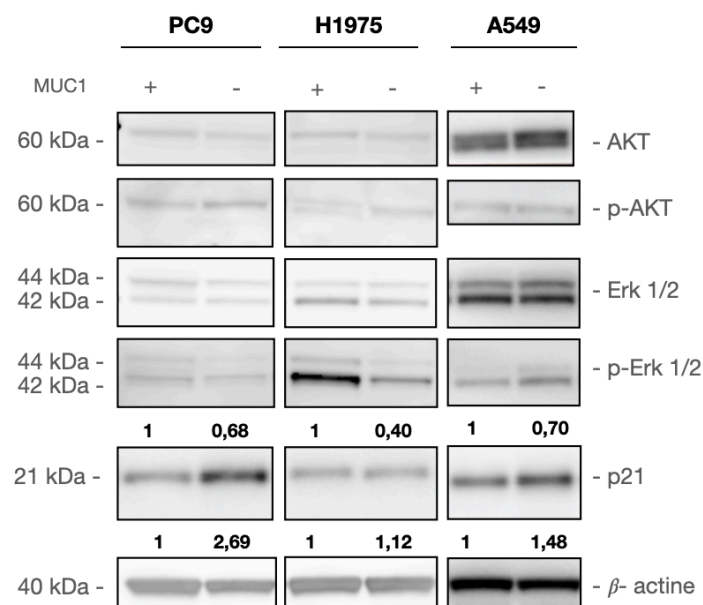


Figure 39 : L'expression de MUC1 induit la prolifération cellulaire, en favorisant la phosphorylation de Erk 1/2 et la diminution d'expression de p21.

L'expression de AKT et Erk 1/2 ainsi que leur phosphorylation respective a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge ainsi que pour la quantification, *via* le logiciel ImageJ.

En conclusion, l'expression de MUC1 au sein des lignées cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires favorise la prolifération et active la voie MAPK *via* la phosphorylation de Erk 1/2. Son invalidation diminue la prolifération, ainsi que la phosphorylation de Erk 1/2.

b) MUC1 et viabilité cellulaire.

Dans un second temps, l'impact de l'expression de MUC1 sur la viabilité cellulaire a été mesuré. Les résultats obtenus montrent que la surexpression de MUC1 dans la lignée PC9 favorise la viabilité cellulaire en comparaison avec la lignée transfectée avec le vecteur vide (PC9-) (Figure 40A). Des résultats similaires sont obtenus dans les lignées H1975, A549 (Figure 40B et C), HCC827 et H292 (Figure S3). En effet, au sein de ces différentes lignées cellulaires, l'expression de MUC1 accroît significativement la viabilité cellulaire. En revanche, l'invalidation de MUC1 par CRISPR/Cas9 diminue significativement ce phénomène.

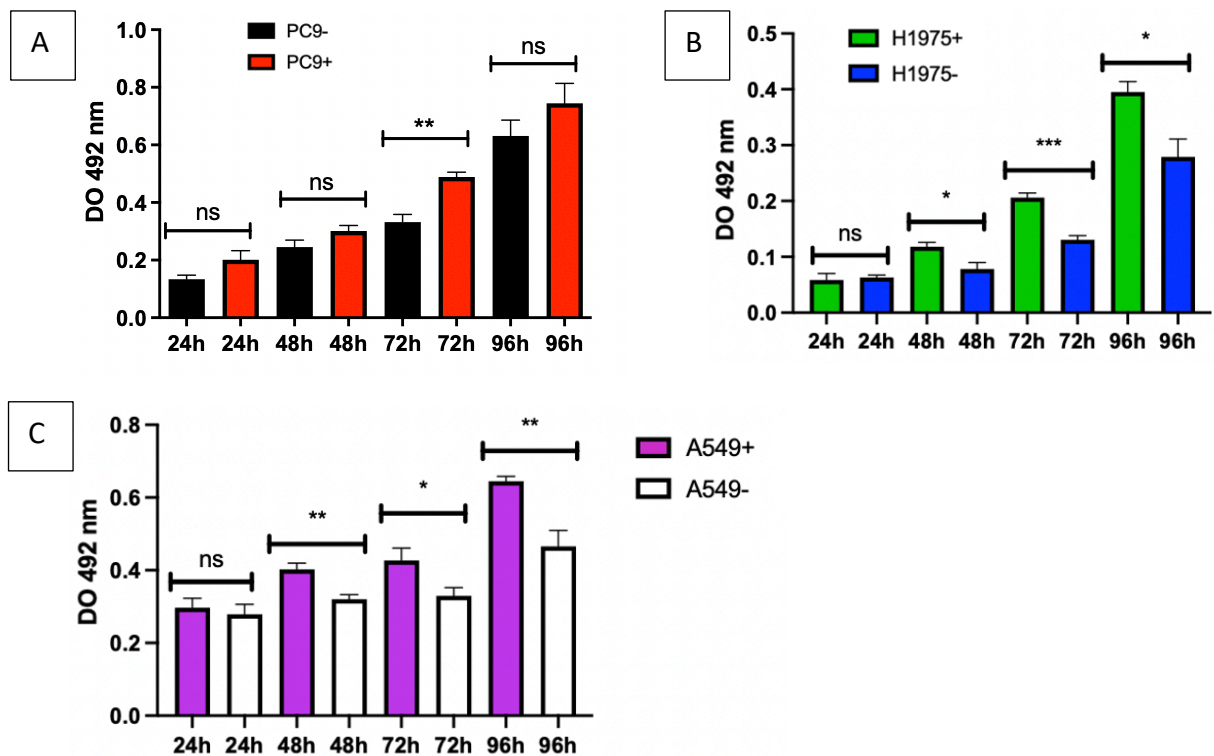


Figure 40 : L'expression de MUC1 favorise la viabilité cellulaire.

Tests de viabilité (MTS) réalisés à 24, 48, 72 et 96h après ensemencement sur les cellules (A) PC9, (B) H1975, (C) A549 exprimant ou non MUC1 (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En conclusion, les cellules exprimant MUC1 présente une viabilité cellulaire favorisée.

L'invalidation de MUC1 diminue cette propriété.

c) Migration et Invasion.

La migration et l'invasion sont deux caractéristiques des cellules cancéreuses, nécessaires et préalables à la dissémination métastatique. La migration cellulaire correspond au déplacement actif des cellules en réponse à un stimulus, nécessaire en condition physiologique au cours de l'embryogenèse et de la réparation des lésions. L'invasion cellulaire est un processus lié à la migration cellulaire, qui permet aux cellules de se détacher de la membrane basale, et de dégrader la matrice extracellulaire environnante afin d'envahir les tissus voisins et/ou la circulation sanguine (Mittal., 2018). Néanmoins, en condition cancéreuse ces mécanismes sont détournés et permettent la progression tumorale ainsi que la dissémination métastatique.

i) La migration.

Pour mesurer la capacité migratoire des différents modèles exprimant ou non MUC1, des tests de réparation du tapis cellulaire confluent ont été réalisés. Après un traitement de 2h à la mitomycine C, un inhibiteur du cycle cellulaire, des blessures standardisées ont été réalisées sur un tapis cellulaire confluent grâce au WoundMaker (Essen Bioscience). Le pourcentage de confluence de la blessure est déterminé grâce à la technologie Incucyte®, afin de déterminer la vitesse de migration respective à chacune des lignées cellulaires testées. La fermeture totale de la blessure est rapidement observable pour les cellules PC9+ (30h post-blessure), alors qu'au même moment la blessure est refermée à 82% pour les cellules PC9- ($p < 0,001$; Figure 41A). Les cellules H1975+ migrent plus rapidement que les H1975- et cela est observable dès 12h après la blessure ($p < 0,05$). 48h post blessure, celle-ci est refermée à 47,41% pour les cellules H1975+ contre 12,78% pour les cellules H1975- ($p < 0,0001$; Figure 41B). La migration plus rapide des cellules A549+ est observable 16h après la blessure du tapis cellulaire. 72h post-blessure du tapis cellulaire confluent, la blessure est fermée à 87,02% contre 62,90% pour les cellules A549- ($p < 0,001$; Figure 41C). Des résultats similaires sont observables pour les lignées HCC827 et H292. En effet, pour les cellules HCC827+ la fermeture de la blessure est supérieure à la fermeture de la blessure des cellules HCC827-, dès 4h après la blessure ($p < 0,05$). Après 40h, la blessure est refermée à 76,78% pour les cellules HCC827+ contre 66% pour les cellules HCC827- ($p < 0,05$, Figure S4A). Enfin pour les cellules H292 +, leur migration est très rapide et la blessure est totalement refermée 16h après ($p < 0,0001$) contre 60,53% de fermeture pour les cellules H292-. L'ensemble de ces données montrent que l'expression de MUC1 favorise la fermeture plus rapide des blessures, suggérant une migration plus rapide des cellules. L'invalidation de MUC1 permet de contrecarrer ce phénomène : les blessures sont moins refermées suggérant que les cellules n'exprimant pas MUC1 migrent moins vite.

Pour aller plus loin et confirmer ces résultats, des tests de migration en chambre de Boyden ont été réalisés. La surexpression de MUC1 dans la lignée PC9 augmente la migration des cellules de 27% ($p < 0,05$) (Figure 41D). L'invalidation de MUC1 dans les lignées H1975 et A549 diminue la migration des cellules respectivement de 20% ($p < 0,01$) et de 23% ($p < 0,05$) (Figure 41E et F). L'invalidation de MUC1 dans les lignées HCC827 et H292 montrent une différence significative de migration : en effet, les cellules HCC827+ et H292+ migrent plus que les cellules HCC827- et H292- et ceci de manière significative (H292 : $p < 0,05$; HCC827 : $p < 0,001$; Figure S4C et D).

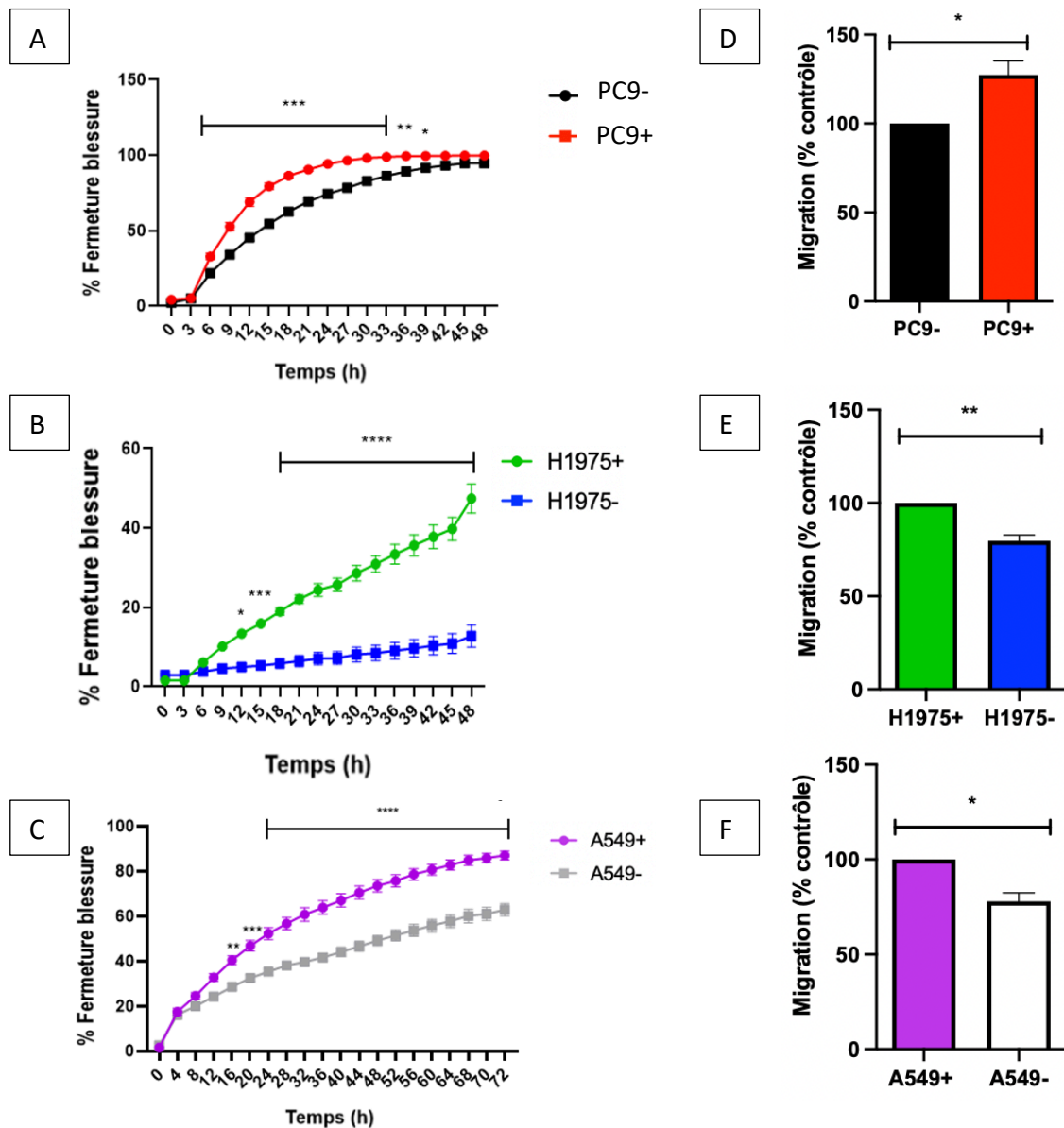


Figure 41 : Mesure des capacités migratoires des modèles cellulaires : MUC1 favorise la migration cellulaire. Mesure de la confluence relative de la blessure standardisée réalisée à l'aide du WoundMarker (Essen Bioscience) dans les cellules PC9 (A), H1975 (B) et A549 (C), exprimant ou non MUC1 (n=3). Détermination des capacités migratoires des modèles cellulaires PC9 (D), H1975 (E) et A549 (F) exprimant ou non MUC1, par l'intermédiaire de Chambre de Boyden. 24h après l'ensemencement, les cellules ayant migré ont été lysées, colorées et la fluorescence émise mesurée. La fluorescence obtenue est proportionnelle au nombre de cellules ayant migrées. Les résultats ont été normalisés par rapport à la lignée parentale contrôle (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001.

L'ensemble de ces données suggèrent que l'expression de MUC1 favorise la migration et que son invalidation diminue cette propriété.

ii) L'invasion.

Afin d'étudier les capacités invasives des différents modèles cellulaires, exprimant ou non MUC1, des chambres de Boyden recouvertes d'ECmatrix®, ont été utilisées. Les résultats montrent que 1,9 fois plus de cellules PC9+ ont dégradé et envahi la matrice (PC9+ = 1 455 000 % ± 106 731 vs PC9- = 789 272 % ± 64 310). Les cellules PC9+ sont donc plus invasives que les cellules PC9- ($p < 0,001$; Figure 42A). L'inactivation de MUC1 dans les cellules H1975, diminue de 31% le nombre de cellules ayant dégradé et envahi la matrice ($p < 0,001$; Figure 42B). Des résultats similaires sont obtenus pour les cellules A549. En effet, l'inactivation de MUC1 diminue de 29% l'invasion ($p < 0,01$; Figure 42C). Des résultats présentant les mêmes allures sont obtenus pour les lignées HCC827 et H292. L'inactivation de MUC1 par une technique CRISPR/Cas9 diminue de 45% l'invasion des cellules HCC827 ($p < 0,001$; Figure S5A) et de 28% l'invasion des cellules H292 ($p < 0,05$; Figure S5B). En conclusion, l'expression de MUC1 induit la capacité invasive, alors que son extinction permet de diminuer considérablement l'invasion.

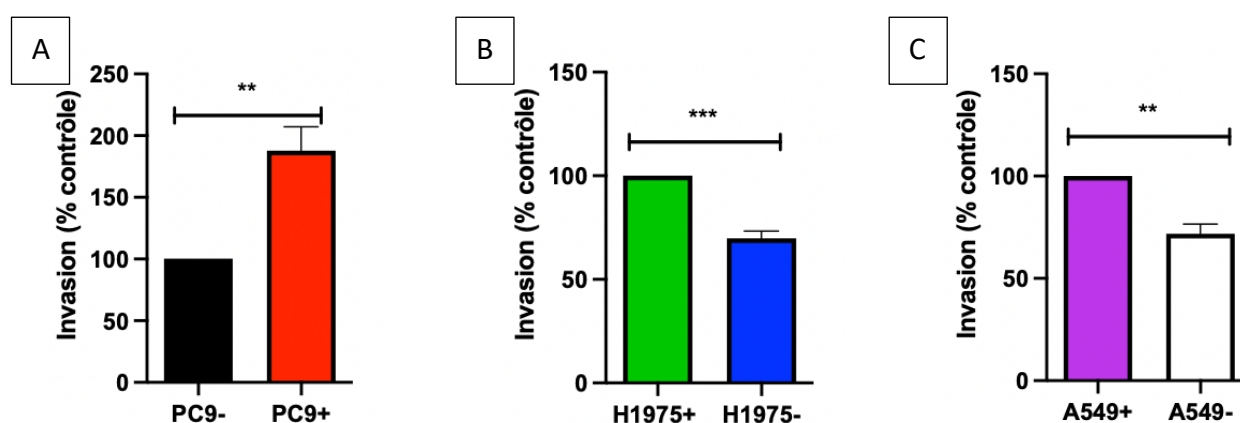


Figure 42 : L'expression de MUC1 au sein des différents modèles cellulaires favorise les capacités invasives.

Mesure des capacités invasives des cellules PC9 (A), H9175 (B) et des cellules A549 (C) exprimant ou non MUC1 par l'intermédiaire de chambre de Boyden recouverte d'ECmatrix®. 24h après ensemencement, les cellules ayant envahi la membrane sont colorées et lysées. La fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules ayant dégradé la matrice et ayant migré vers le compartiment enrichi en SVF. Les résultats ont été normalisés par rapport au clone parentale (n=3). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

L'ensemble de nos résultats permet de confirmer le rôle de MUC1 dans la migration et dans l'invasion des cellules cancéreuses pulmonaires, suggérant son rôle dans la dissémination métastatique ainsi que la progression tumorale. L'inactivation de MUC1 permet de diminuer les capacités migratoires et invasives.

d) Étude de la formation de clones à partir d'une cellule unique.

Pour déterminer le rôle de MUC1 sur la capacité à former des colonies, un test de clonogénicité a été réalisé.

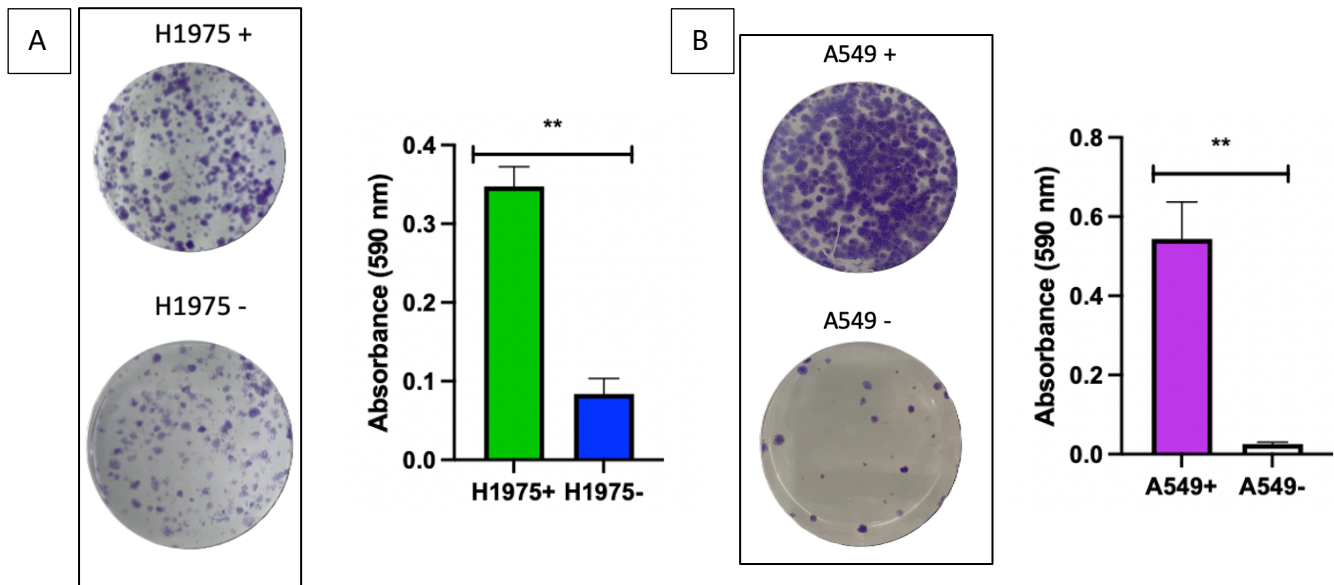


Figure 43 : L'expression de MUC1 favorise la clonogénicité des cellules H1975 et A549.

Test de clonogénicité réalisé sur les cellules H1975 (A) et A549 (B), exprimant ou non MUC1. Les colonies ont été colorées avec du crystal violet 14 jours après l'ensemencement. Une quantification du crystal violet fixé a été réalisée, après extraction. L'absorbance mesurée à 590 nm est proportionnelle aux nombres de colonies formées (n=3). ** p<0,01.

De manière empirique et après coloration au crystal violet des différentes conditions, le nombre de colonies formées semblent plus important dans les lignées H1975 et A549 exprimant MUC1 (Figure 43), mais aussi au sein des lignées HCC827+ et H292+ (Figure S6). L'invalidation de MUC1 par une stratégie CRISPR/Cas9 semble diminuer considérablement le nombre de colonies formées. La mesure de l'absorbance après extraction du crystal violet fixé confirme ces résultats. L'expression de MUC1 favorise significativement la clonogénicité dans les différents modèles cellulaires : l'absorbance mesurée est multipliée par 3,5 dans les cellules H1975+ (p<0,01), par 5 dans les cellules A549+ (p<0,01), par 2 dans les cellules HCC827+ (p<0,05) (Figure S6A) et par 3 dans les cellules H292+ (p<0,05) (Figure S6B).

L'absorbance mesurée étant proportionnelle aux nombres de colonies formées, nous pouvons conclure que l'expression de MUC1 favorise la clonogénicité au sein de nos modèles cellulaires. Son invalidation diminue le pouvoir clonogénique.

e) MUC1 et apoptose :

Enfin, le rôle de MUC1 dans l'induction de l'apoptose, un processus de mort cellulaire programmée, a été étudié par western blot. En effet, MUC1 est connue pour protéger de l'induction de l'apoptose en pathologie cancéreuse (Ren *et al.*, 2004). Pour cela, les expressions de Parp-1, de Parp1-clivée et de la caspase 3 clivée ont été déterminées, à un niveau basal sans aucun traitement, afin de conclure sur le rôle de MUC1 dans le processus apoptotique.

Parp1 est le dernier intermédiaire clivé, et permet l'enclenchement de la réponse apoptotique. Les résultats obtenus montrent moins de clivage de Parp1, lorsque MUC1 est exprimée dans les cellules PC9 et H1975, et plus de clivage de Parp1 dans les lignées n'exprimant pas MUC1. Aucune différence n'est observable entre les cellules A549+ et A549-. En revanche, que ce soit avec ou sans l'expression de MUC1, et quel que soit la lignée cellulaire, il n'y pas de clivage de la caspase 3 d'observable. Ces résultats nous permettent de dire que MUC1 protège de l'initiation du processus apoptotique au sein des modèles cellulaires PC9 et H1975. Dans les cellules A549 exprimant ou non MUC1, il n'y a pas de différence au niveau de l'apoptose basale.

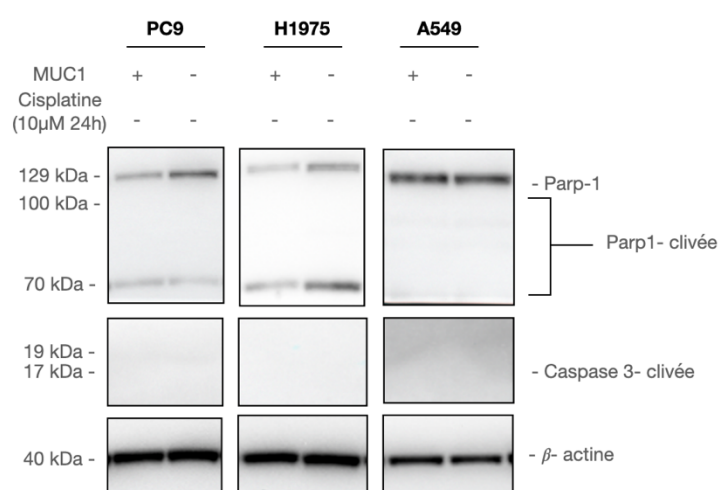


Figure 44 : MUC1 protège de l'induction de la mort cellulaire par apoptose dans les lignées PC9 et H1975. L'expression de Parp-1, de Parp1-clivée et de la caspase 3 clivée a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge.

En conclusion, MUC1 est une actrice de la progression tumorale. En effet, l'expression de MUC1 au sein de nos différentes lignées cellulaires favorise (i) la prolifération, (ii) la viabilité cellulaire, (iii) la migration, (iv) l'invasion, (v) la capacité à former des colonies après un ensemencement à faible densité et (vi) protège de l'initiation du processus apoptotique au niveau basal.

Partie 2 : Rôle de MUC1 dans la chimiorésistance au cisplatine.

Malgré les avancées dans la prise en charge des cancers du poumon et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, la chimiothérapie cytotoxique à base de sels de platine demeure un des traitements de référence. Le cisplatine, bien qu'il soit une drogue relativement ancienne, reste encore largement utilisé pour ses effets antinéoplasiques. Néanmoins, son utilisation est limitée car de nombreux patients acquièrent des résistances. Notre objectif est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la résistance, afin de permettre une meilleure prise en charge des patients.

1) Expression de MUC1 et traitement au cisplatine.

Dans un premier temps, nous avons voulu voir si un traitement au cisplatine pouvait moduler l'expression de MUC1. Pour cela, après une cinétique de traitement au cisplatine, l'expression de MUC1 a été déterminée par western blot.

Les cellules H1975 + ont été traités pendant 6, 24, 48 et 72h avec 10 μ M de cisplatine. La condition non traitée a été utilisée comme contrôle. Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'expression de MUC1-C au-delà de 24h de traitement au cisplatine. L'expression de MUC1 est augmentée de 37% après 72h de traitement (Figure 45). **L'expression de MUC1 est donc augmentée après une exposition au cisplatine.**

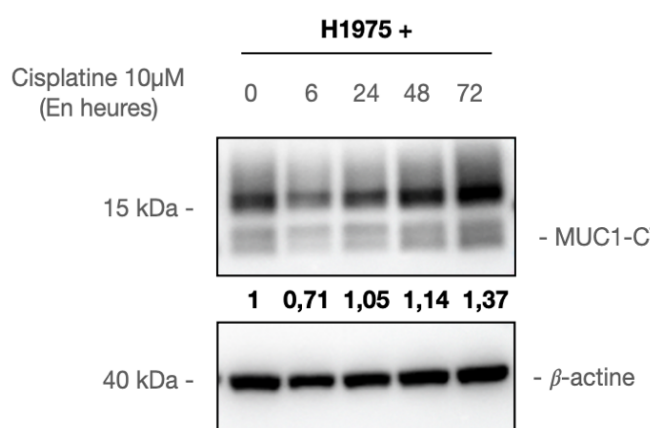


Figure 45 : Un traitement au cisplatine augmente l'expression de MUC1 au cours du temps.

L'expression de MUC1-C a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux, après traitement avec 10 μ M de cisplatine pendant 24h. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge et pour la quantification grâce au logiciel ImageJ (n=3).

2) MUC1 et mécanismes de la chimiorésistance au cisplatine.

Le rôle de MUC1 dans la résistance au cisplatine a déjà été montré dans les cancers de la sphère urogénitale, dans le cancer du pancréas mais aussi dans le cancer du sein triple négatif. Nous avons donc voulu voir si c'était également le cas dans le CBNPC. Les résultats préliminaires obtenus lors d'un ciblage de MUC1 par un siRNA (Figure 35B) avait permis de mettre en évidence le rôle de MUC1 dans l'acquisition de la résistance au cisplatine dans le CBNPC.

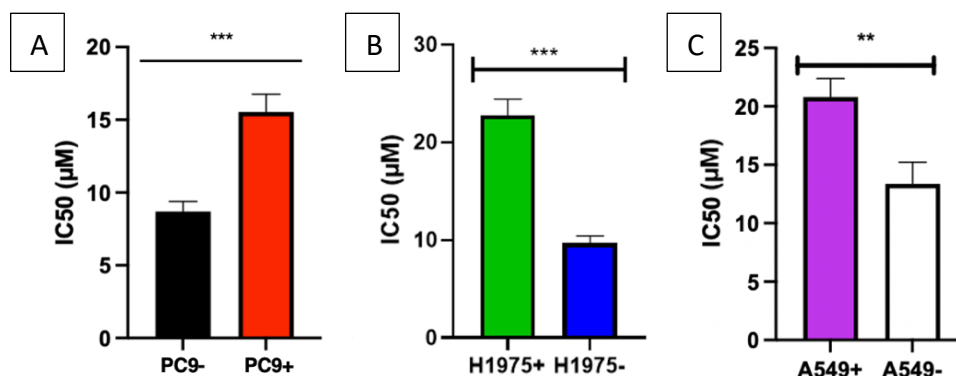


Tableau 4 :

Lignée cellulaire	IC50 (μM) MUC1 +	IC50 (μM) MUC1 -
PC9	15,52 ± 1,22	8,68 ± 0,75
H1975	23,93 ± 1,13	10,74 ± 0,56
A549	20,80 ± 1,58	13,36 ± 1,87
HCC827	24,24 ± 1,59	14,87 ± 0,99
H292	9,12 ± 0,84	4,70 ± 0,30

Figure 46 : Les cellules exprimant MUC1 sont plus chimiorésistantes au cisplatine.

24h après ensemencement, les cellules PC9 (A), H1975 (B) et A549 (C) exprimant ou non MUC1 ont été traitées avec des doses croissantes de cisplatine (0 à 200 μM). 72h après le traitement au cisplatine, un test MTS a été réalisé afin de déterminer les IC50 respectives à chacune des lignées (Tableau 4). ** p<0,01 ; *** p<0,001

Afin de confirmer ces résultats dans nos modèles cellulaires, la concentration inhibitrice 50 (IC50), un paramètre révélateur de la sensibilité des cellules à une drogue donnée, de chacune des lignées a été déterminée. Pour cela, les cellules ont été exposées à des doses croissantes de cisplatine (de 0 à 200 μM), pendant 72h, suivi d'un test MTS. Comme attendu, les cellules PC9 surexprimant MUC1 de manière stable sont moins chimiosensibles au cisplatine, avec une valeur d'IC50 multipliée par 2 (Tableau 4) (Figure 46A). De manière intéressante, le phénomène inverse est observable dans les lignées H1975 (Figure 48B), A549 (Figure 46C), HCC827 et H292 (Figure S7) lorsque MUC1 est invalidée. En effet, l'invalidation de MUC1 chimiosensibilise de manière significative les cellules au cisplatine (Tableau 4). Les cellules exprimant MUC1 présentent une résistance plus importante au cisplatine et

l'invalidation de MUC1 permet d'inverser le phénomène, rendant les cellules plus sensibles au cisplatine.

Des tests de clonogénicité sur les cellules H1975, exprimant ou non MUC1, et traités avec des doses croissantes de cisplatine pendant 15 jours ont été réalisés. De manière empiriques, on peut observer un nombre plus important de colonies formées pour les cellules H1975+ sans traitement cisplatine. Par la suite, quel que soit la concentration de cisplatine utilisée, le nombre de colonies est plus important quand les cellules H1975 expriment MUC1. L'invalidation de MUC1 diminue le nombre de colonies formées (Figure 47A et B). Ces résultats ont été confirmés suite à l'extraction du crystal violet et sa quantification, par mesure de l'absorbance à 590nm. Les résultats obtenus montrent que sans traitement au cisplatine, le nombre de colonies formées par les cellules H1975+ est plus important que les cellules H1975-. Par la suite quel que soit la concentration en cisplatine utilisée, le nombre de colonies formées est toujours supérieur dans les cellules H1975 exprimant MUC1, et ceci de manière significative jusqu'à 10 μ M (de 3 fois environ) (Figure 47C).

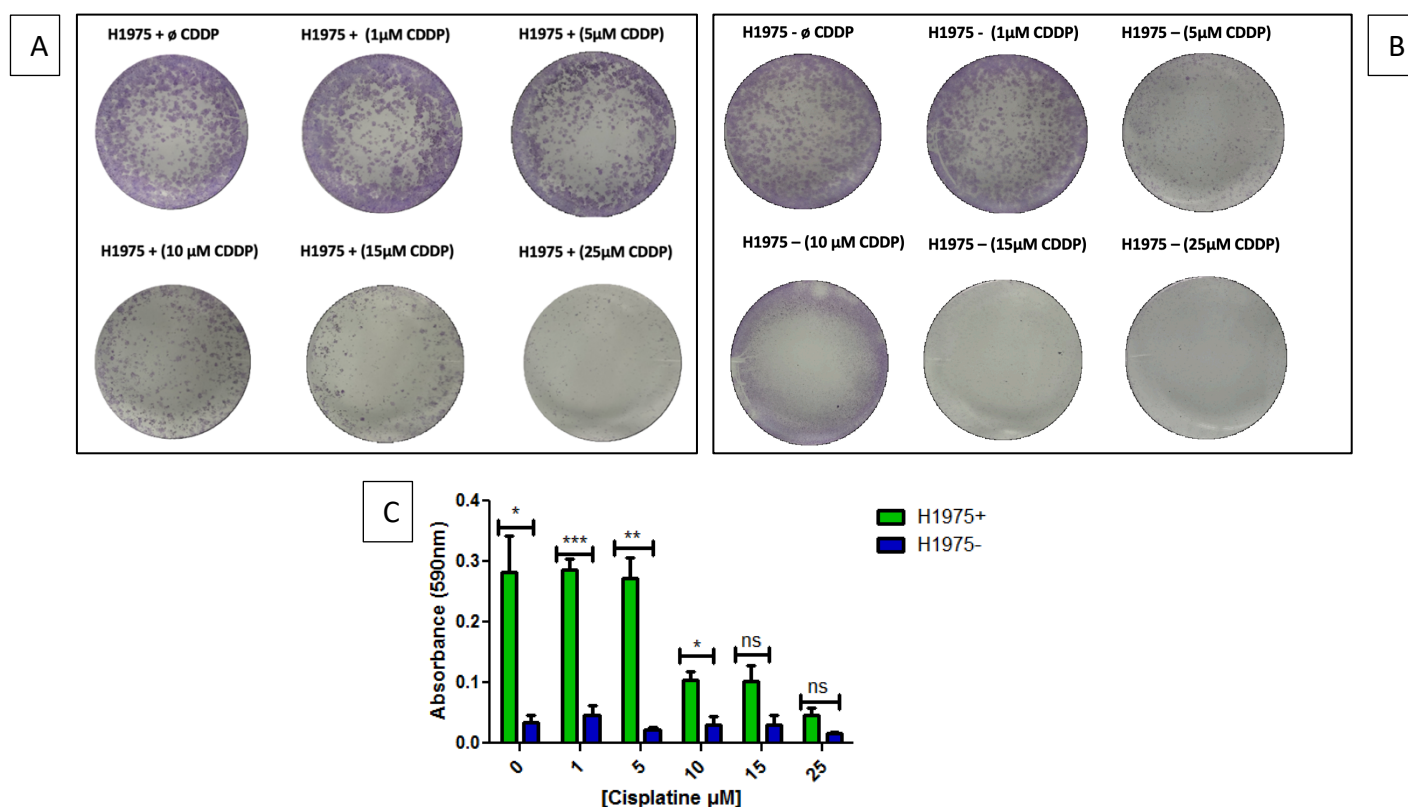


Figure 47 : L'expression de MUC1 favorise la clonogénicité malgré un traitement cisplatine avec des doses croissantes.

Test de clonogénicité réalisés sur les cellules H1975 exprimant ou non MUC1. Les cellules ont été ensemencées à faible densité (1000 cellules/puits). Les différentes conditions ont été traitées avec du cisplatine (CDDP) (de 0 à 25 μ M) pendant 15 jours. Les colonies ont été colorées avec du crystal violet. Une quantification du crystal violet fixé a été réalisée, après extraction. L'absorbance mesurée à 590 nm est proportionnelle aux nombres de colonies formées (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

Les cellules exprimant MUC1 sont donc résistantes au cisplatine et l'invalidation de MUC1 permet d'inverser le phénomène, rendant les cellules plus sensibles au cisplatine. A partir de ces observations, nous avons voulu comprendre par quels mécanismes moléculaires et cellulaires, MUC1 induit la résistance au cisplatine. Le mode d'action du cisplatine est bien connu dans la littérature (Figure 9) et nous allons procéder étape par étape dans son mode d'action, afin de déterminer quels sont les mécanismes mis en jeu par MUC1 pour induire la chimiorésistance. Pour la suite des expériences, les cellules PC9 et H1975 seront traitées avec 10 μ M de cisplatine et les cellules A549 avec 14 μ M de cisplatine, ce qui correspond à la valeur d'IC50 des lignées KO pour MUC1.

a) MUC1 et dommages à l'ADN.

Il est admis que le cisplatine est un agent alkylant, qui par définition, va agir en induisant des dommages à l'ADN, dont des cassures simples et doubles brins. Ces cassures générées peuvent être réparées par les différents mécanismes de réparation de l'ADN. Mais lorsque ces cassures deviennent trop abondantes et s'accumulent, les mécanismes de réparations de l'ADN ne sont plus suffisants et l'arrêt du cycle cellulaire survient, pour *in fine* mener à l'apoptose (Dasari et Tchounwou., 2016).

L'induction des dommages à l'ADN, dont des cassures doubles brins, étant le mode d'action principal du cisplatine, nous sommes, dans un premier temps, intéressés aux cassures de l'ADN induites par le cisplatine au sein de nos différents modèles cellulaires exprimant ou non MUC1. Pour cela, l'expression de γ H2AX, un variant d'histone H2AX phosphorylé qui permet le recrutement de mécanismes de réparation de l'ADN (Yamamoto *et al.*, 2019) et de 53BP1, une protéine recrutée au niveau des sites de cassures doubles brins de l'ADN afin de permettre la mise en place du système de réparation NHEJ (Rass *et al.*, 2022), ont été évalués, par western blot. Les dommages à l'ADN double brin ont également été étudiés par immunofluorescence grâce au dénombrement des foci γ H2AX et p-ATM.

Après un traitement au cisplatine 10 μ M pendant 24h, les résultats montrent moins de phosphorylation de H2AX et moins d'expression de 53BP1 dans les cellules PC9+ en comparaison avec la lignée PC9 parentale qui n'exprime pas MUC1 (PC9-), indiquant moins de dommages à l'ADN induits par le cisplatine. Dans la lignée H1975+ et A549+, des résultats similaires sont observables. L'invalidation de MUC1 dans les cellules H1975 et A549, augmente l'expression de 53BP1 ainsi que l'accumulation du variant γ H2AX, indiquant l'induction de plus de cassures doubles brins par le cisplatine (Figure 48A).

Ces résultats ont été confirmés par immunofluorescence et dénombrement des foci γ H2AX (Figure 48 B, C, D) et p-ATM (Figure S8) induit par un traitement au cisplatine. La condition non traitée au cisplatine pendant 24h a été utilisée comme contrôle, et nous permet de confirmer que le cisplatine induit des dommages à l'ADN. Après un traitement cisplatine à 10 μ M pour les PC9 et H1975 ou 14 μ M pour les A549 pendant 24h, l'expression de MUC1 est associée à la diminution significative du nombre de foci γ H2AX. L'inactivation de MUC1 au sein des lignées H1975 et A549, multiplie le nombre de foci par 2 dans les cellules H1975 et par 1,5 dans les cellules A549. Concernant les foci p-ATM, les résultats suivent la même tendance que pour les foci γ H2AX : l'expression de MUC1 dans les lignées PC9, H1975 et A549 est corrélée avec une diminution significative des foci p-ATM, alors que l'inactivation de MUC1 est corrélée à une augmentation significative des foci p-ATM et donc des dommages à l'ADN (respectivement multiplié par 1.5, 3 et 2) (Figure S8).

Pour aller plus loin dans cette étude, des essais comètes ont été réalisés sur ces différentes lignées cellulaires, afin de quantifier les dommages à l'ADN simples et doubles brins induits par le cisplatine (Figure 48E, F, G). De manière empirique, nous pouvons voir que l'expression de MUC1 est associée à des queues de comètes plus courtes. En revanche, la non expression de MUC1 dans les cellules PC9 ou l'inactivation de MUC1 par une technique CRISPR/Cas9 dans les cellules H1975 et A549, est associée à des queues de comètes plus longues. Après analyse *via* le logiciel ImageJ, nous avons pu déterminer le « tail moment » (Longueur queue x intensité fluorescence totale) respectif à chaque lignée, un paramètre proportionnel à la quantité de dommages à l'ADN. Les résultats montrent que les « tails moment » sont moins élevés dans les cellules PC9, H1975 et A549 exprimant MUC1. La non expression ou l'inactivation de MUC1 permet d'augmenter significativement le « tail moment » de chacune des lignées (PC9 + = $42,68 \pm 1,82$ vs PC9- = $66,30 \pm 1,45$, $p < 0,0001$; H1975 + = $40,26 \pm 4,05$ vs H1975 - = $51,03 \pm 1,85$, $p < 0,01$; A549+ = $48,05 \pm 1,67$ vs A549- = $63,42 \pm 1,79$, $p < 0,0001$) (Figure 48 H, I, J).

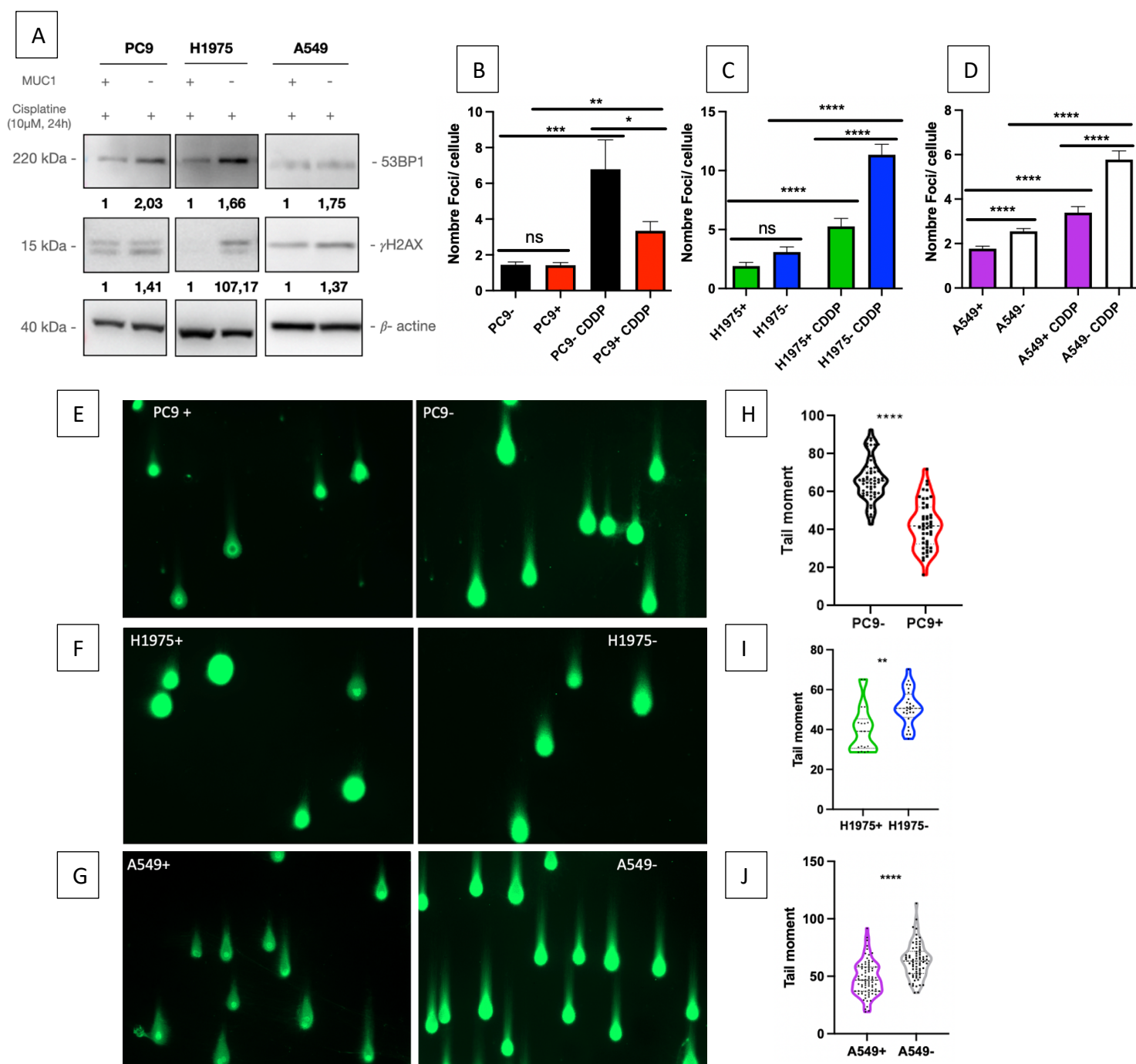


Figure 48 : L'expression de MUC1 protège des dommages à l'ADN.

L'expression de γ H2AX et 53BP1 a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux, après un traitement au cisplatine de 24h à 10 ou 14 μ M de cisplatine suivant la lignée considérée. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge (A). Dénombrement des foci γ H2AX par immunofluorescence sur lame après traitement ou non au cisplatine (CDDP) 10 μ M pendant 24h, dans les lignées PC9 (B), H1975 (C) et 14 μ M pendant 24h dans les cellules A549 (D) (n=3). Essais comètes réalisés sur les lignées PC9 (E), H1975 (F) et A549 (G) exprimant ou non MUC1, après un traitement au cisplatine de 24h à 10 ou 14 μ M de cisplatine suivant la lignée considérée. Le « tail moment » (longueur queue x intensité fluorescence totale) a été déterminé pour chaque lignée, PC9 (H), H1975 (I) et A549 (J). Sa valeur est proportionnelle à la quantité de dommages à l'ADN générés par le traitement au cisplatine (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001

Pris en ensemble, ces résultats montrent que **MUC1 protège des dommages à l'ADN normalement induit par le cisplatine, en diminuant : (i) la phosphorylation de H2AX, (ii) l'expression de 53BP1, (iii) le nombre de foci γ H2AX et p-ATM, ainsi que (iv) la longueur des queues des comètes et la valeur du « tail moment ».** De manière intéressante, l'invalidation de MUC1 inverse ces résultats et favorise les dommages à l'ADN ainsi que leur accumulation.

b) MUC1, cisplatine et prolifération cellulaire.

Après avoir étudié les dommages à l'ADN, nous nous sommes intéressés à l'étude du cycle cellulaire, car le cisplatine favorise l'accumulation de dommages, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire suivi du déclenchement du processus apoptotique. Plus précisément, l'expression de p21, une protéine inhibitrice du cycle cellulaire, bloquant la transition G1/S du cycle cellulaire, a été étudiée. Après un traitement au cisplatine à 10 μ M pour les cellules PC9 et H1975 ou 14 μ M pour les A549 pendant 24h, une augmentation de l'expression de p21 est observable dans la lignée PC9-, n'exprimant pas MUC1 (Figure 49A). Des résultats similaires sont obtenus pour les lignées H1975 et A549 exprimant ou non MUC1 : l'expression de MUC1 est associée à une faible expression de p21 alors que l'invalidation de MUC1 conduit à une augmentation d'expression de p21 (Figure 49A). Ces résultats montrent qu'un traitement au cisplatine a un effet moindre sur le cycle cellulaire dans les lignées exprimant MUC1. Ces résultats suggèrent donc un rôle protecteur de MUC1 dans l'arrêt du cycle cellulaire.

Pour aller plus loin, le caractère prolifératif a été étudié par un suivi du marquage Ki-67 par immunofluorescence, après un traitement cisplatine 10 μ M pour les cellules PC9 et H1975 ou 14 μ M pour les cellules A549, pendant 24h. Dans un premier temps, nous montrons un rôle du cisplatine dans la diminution du caractère prolifératif, avec une diminution du marquage au Ki-67 entre les conditions non traitées et traitées. Ensuite, les résultats obtenus montrent un pourcentage de cellules positives au marquage Ki-67 supérieur dans les cellules PC9+, par rapport aux cellules PC9-, après un traitement au cisplatine (PC9+ CDDP= 70,47% $\pm$ 4,01 vs PC9- CDDP = 58,94% $\pm$ 2,91 ; $p < 0,05$) (Figure 49B). De même pour les cellules H1975 et A549 exprimant MUC1 : malgré un traitement au cisplatine, il y a plus de marquage au Ki-67 dans ces modèles. L'invalidation de MUC1, dans ces deux dernières lignées, permet de diminuer le nombre de cellules marquées positivement au Ki-67 (H1975 + CDDP= 73,18% $\pm$ 1,84 vs H1975- CDDP = 56,62% $\pm$ 4,17, $p < 0,001$; A549+ CDDP= 74,42% $\pm$ 2,51 vs A549- CDDP = 65,46 % $\pm$ 3,25, $p < 0,05$) (Figure 49B et C). Nous montrons donc que l'expression de MUC1 au sein des différentes lignées augmente le pourcentage de cellules positives au Ki-67, suggérant un rôle de MUC1

dans la prolifération et ceci, malgré un traitement au cisplatine. L'invalidation de MUC1 permet de diminuer le caractère prolifératif.

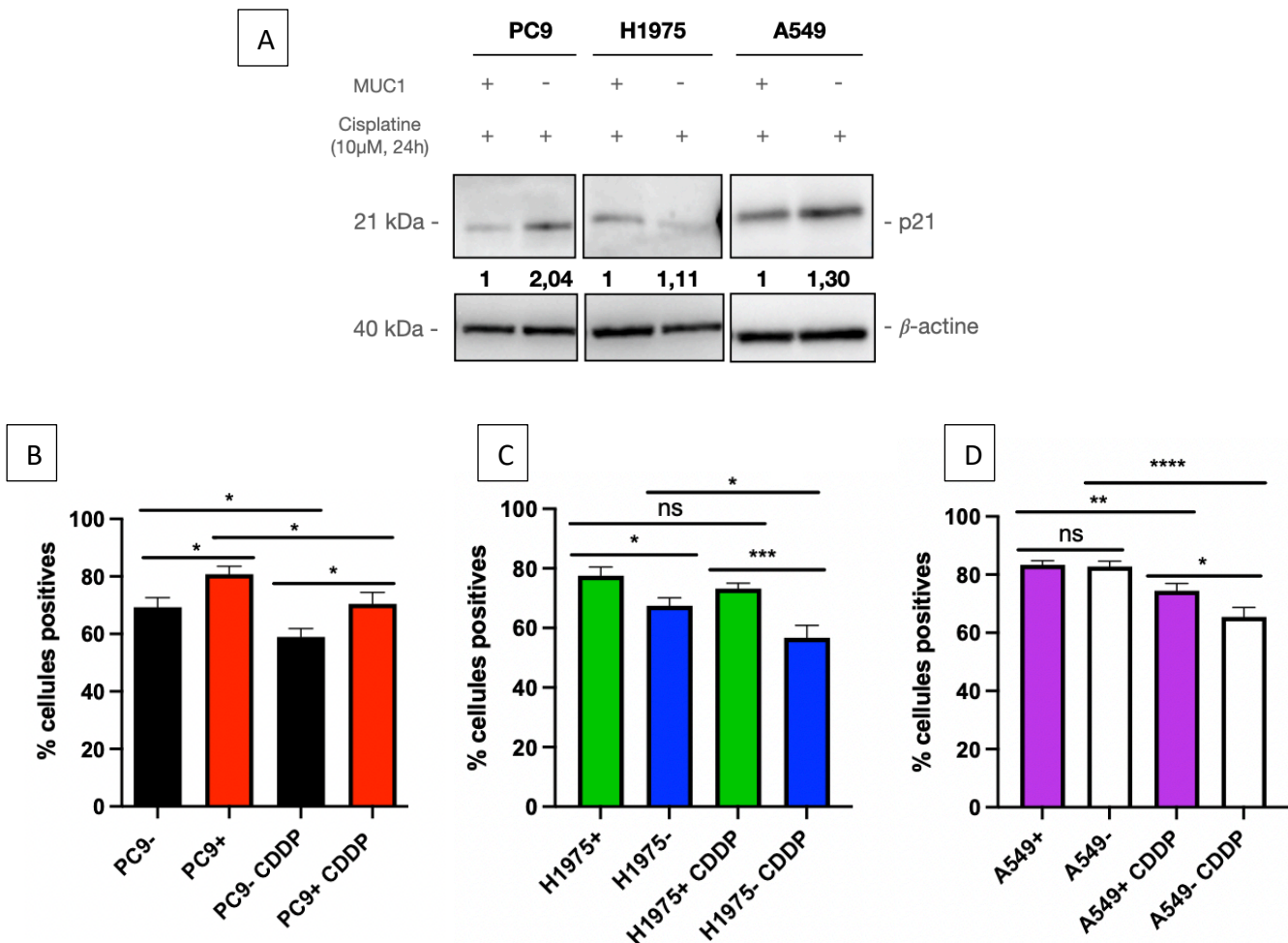


Figure 49 : L'expression de MUC1 protège d'un arrêt du cycle cellulaire et favorise la prolifération, malgré un traitement au cisplatine.

L'expression de p21 a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux après un traitement au cisplatine pendant 24h. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge (n=3) (A). Évaluation du pourcentage de cellules positives au marquage Ki-67, après traitement cisplatine 10µM (CDDP) pour les PC9 et H1975, et 14 µM pendant 24h pour les cellules A549, par immunofluorescence sur lame dans les cellules PC9 (B), des cellules H1975 (C) et des cellules A549 (D) (n=3). La condition non traitée est utilisée comme contrôle. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001

Ensemble, ces résultats montrent que l'expression de MUC1 protège d'un arrêt du cycle et favorise la prolifération, malgré un traitement au cisplatine.

c) MUC1, cisplatine et apoptose.

Après avoir étudié le rôle de MUC1 sur les dommages à l'ADN et sur le cycle cellulaire, nous nous sommes intéressés au processus apoptotique. Après induction et accumulation de dommages à l'ADN, le cisplatine a pour objectif de conduire la cellule cancéreuse vers la mort cellulaire programmée ou apoptose. Afin de déterminer si MUC1 module la réponse apoptotique induite par le cisplatine, le clivage de Parp1 et de la caspase 3 mais aussi l'expression de Bax, une protéine pro-apoptotique mitochondriale dont le recrutement initie la réponse apoptotique intrinsèque, ont été étudiés.

Par western blot, nous mettons en évidence qu'un traitement à 10 μ M pour les cellules PC9 et H1975 ou 14 μ M pour les cellules A549 de cisplatine pendant 24h, induit une forte expression de la forme clivée de la Parp1 dans la lignée PC9 n'exprimant pas MUC1. Lorsque MUC1 est surexprimée de manière stable au sein de cette même lignée, il y a moins de clivage de Parp1. Les résultats vont dans le même sens pour les lignées H1975 et A549, avec une augmentation du clivage de Parp1 dans les lignées invalidées pour MUC1 par une technique CRISPR/Cas9 (Figure 50A). Ensuite, le clivage de la caspase 3 a été étudié après un traitement au cisplatine. Nous montrons qu'un traitement au cisplatine, induit le clivage de la caspase 3 dans nos différents modèles exprimant ou non MUC1 (en comparaison avec la figure 44 où il n'y avait aucun clivage de la caspase 3, sans traitement au cisplatine). Nous montrons une diminution du clivage de la caspase 3 dans les lignées PC9, H1975 et A549 exprimant MUC1. De manière intéressante, le clivage de la caspase 3 est augmentée dans ces mêmes lignées lorsque MUC1 n'est pas exprimée ou invalidée (Figure 50A). Enfin, toujours après un traitement au cisplatine de 24h, l'expression de Bax a été étudiée. Nous constatons que l'expression de Bax est inversement corrélée à celle de MUC1 : quand MUC1 est exprimée, l'expression de Bax est diminuée au sein des trois modèles et quand MUC1 n'est pas exprimée, l'expression de Bax est augmentée (Figure 50A).

Pour aller plus loin, un dosage enzymatique de l'activité des caspases 3 et 7 a été effectué *via* le kit Caspase 3/7 Glo (Promega®). Bien que les résultats obtenus pour la lignée PC9 ne soient pas en accord avec ceux obtenus par western blot (Figure 50B), ceux obtenus pour la lignée H1975 confirment les résultats précédents. En effet pour les cellules H1975, nous notons une augmentation de l'activité des caspases 3/7, après traitement au cisplatine, et cette augmentation est plus importante lorsque MUC1 est invalidée (H1975 + CDDP = 1,080 RFU/mg $\pm$ 0,05 vs H1975- CDDP = 4,48 RFU/mg $\pm$ 0,28, $p < 0,0001$) (Figure 50C). Pour les cellules A549, les résultats obtenus semblent présenter la même

tendance, avec une forte augmentation de l'activité des caspases 3/7, lorsque MUC1 est invalidé et les cellules traitées au cisplatine (Figure 50D).

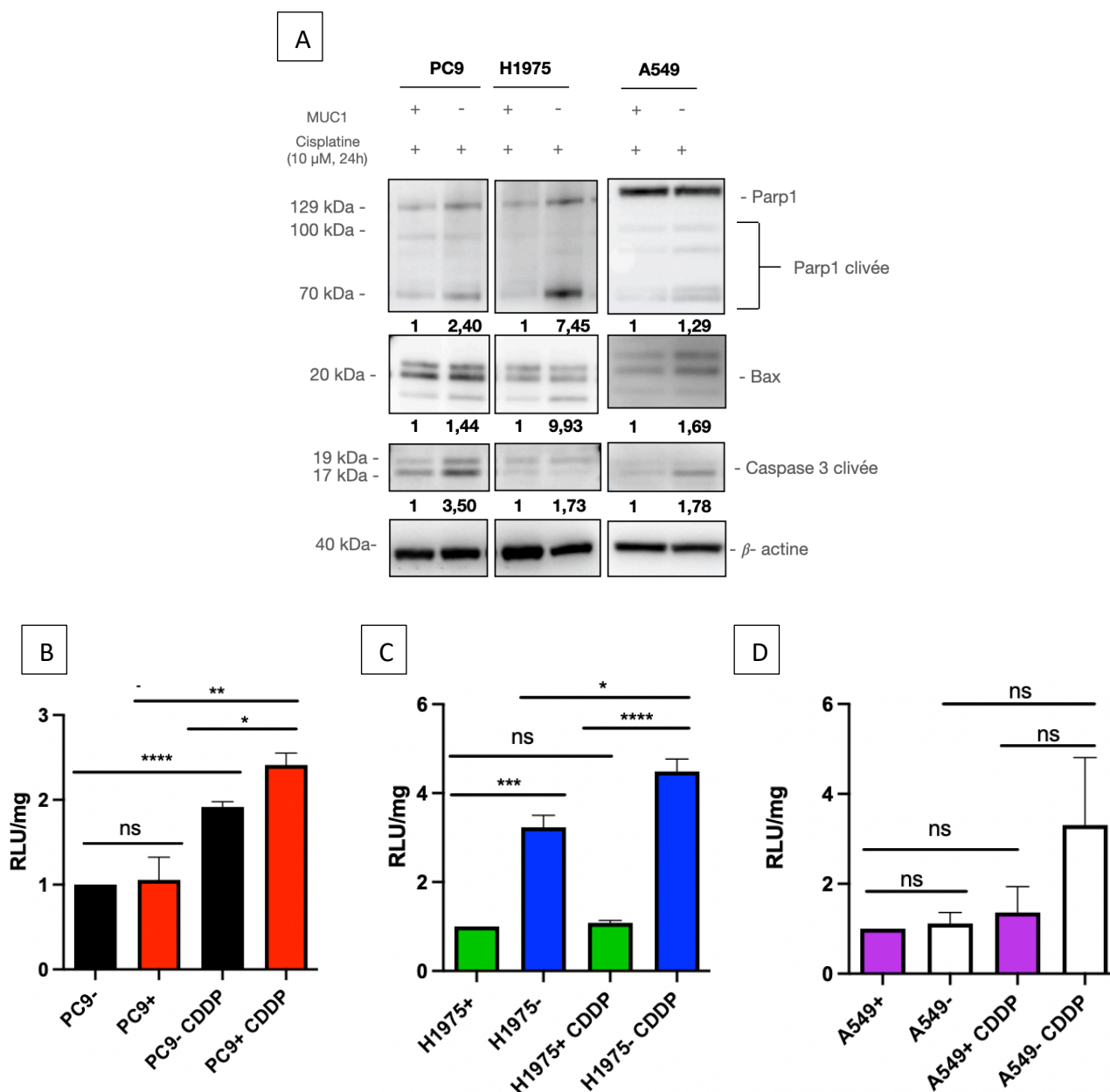


Figure 50 : L'expression de MUC1 protège de l'entrée en apoptose, en diminuant le clivage de PARP1, de la caspase 3 et l'expression de Bax.

L'expression de Bax, de Parp1-clivée et de la caspase 3 clivée a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux, après traitement au cisplatine 10 μ M pour les H1975 et PC9, et 14 μ M pour les A549, pendant 24h. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge (A). Mesure de l'activité des caspases 3/7 *via* le Kit Caspase 3/7 Glo (Promega®) dans les lignées PC9 (B), H1975 (C) et A549 (D) exprimant ou non MUC1 et traitées ou non au cisplatine 10 μ M ou 14 μ M pendant 24h, suivant la lignée. La luminescence mesurée a été rapportée à la quantité de protéine par condition (RLU/mg de protéines) (n=4). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001

L'ensemble de ces résultats montrent que malgré un traitement au cisplatine, **MUC1 protège de l'induction de l'apoptose en diminuant (i) le clivage de Parp1, (ii) le clivage de la caspase 3, (iii) l'expression de protéine pro-apoptotique comme bax et (iv) l'activité des caspases 3/7. L'invalidation de l'expression de MUC1 renverse cela et favorise l'induction de l'apoptose.**

d) Autres mécanismes de la résistance.

i) Les transporteurs à influx spécifique au cisplatine.

Afin d'effectuer son action, le cisplatine doit entrer dans la cellule pour y être transformé par « di-aquation », et devenir un puissant électrophile. Il a longtemps été suggéré que le cisplatine entrait dans la cellule uniquement par diffusion passive. Or depuis quelques années, il est maintenant largement admis que le cisplatine entre dans la cellule par l'intermédiaire d'une diffusion facilitée, ayant recours à des transporteurs spécifiques au cisplatine (Makovec, 2019). Ces transporteurs peuvent voir leur activité modulée, et donc être impliqués dans un influx plus ou moins important du cisplatine, conduisant à la résistance aux drogues. L'expression des transporteurs à influx du cisplatine (CTR1, OCT1, OCT2 et OCT3) a été étudiée par RT-qPCR au sein de nos différents modèles exprimant ou non MUC1.

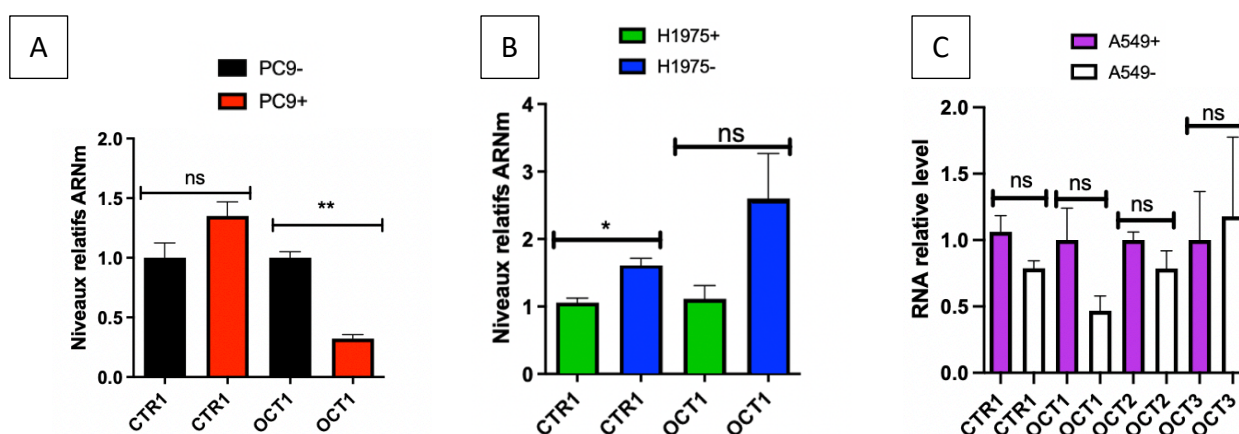


Figure 51 : MUC1 module l'expression relative de certains transporteurs à influx spécifiques du cisplatine.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules PC9 (n=3) (A), H1975 (n=3) (B) et A549 (n=3) (C) exprimant ou non MUC1. * p<0,05 ; ** p<0,01.

En premier lieu, nos différents résultats montrent une distribution de ces transporteurs spécifique à chaque lignée : OCT2 et 3 ne sont pas exprimés dans les lignées PC9 et H1975. Dans la lignée PC9, nous ne montrons pas différence significative de l'expression relative de CTR1. En revanche,

une diminution significative de l'expression d'OCT1, dans la lignée PC9 surexprimant MUC1 de manière stable, est observable ($p < 0,01$) (Figure 51A). Dans la lignée H1975 exprimant MUC1, nous mettons en évidence une diminution d'expression de CTR1. L'inactivation de MUC1 multiplie par 1,7 l'expression de celui-ci. En revanche, nous ne montrons pas de différence significative de l'expression d'OCT1, bien qu'une diminution de l'expression de ce transporteur semble survenir dans la lignée H1975 exprimant MUC1 (Figure 51B). L'expression de ces différents transporteurs a été étudiée dans la lignée A549 exprimant ou non MUC1. En revanche, nous ne montrons pas de différences significatives dans l'expression de ceux-ci (Figure 51C). L'expression de ces transporteurs a été mesurée dans les lignées HCC827 et H292. Pour la lignée HCC827, nous ne montrons pas de différences significatives dans l'expression de CTR1, d'OCT1 et d'OCT2, bien que l'expression de MUC1 semble associée à une diminution d'expression de ces transporteurs. Nos résultats montrent que l'expression de MUC1 diminue significativement l'expression d'OCT3 et que l'inactivation de MUC1 multiplie par 3,5 l'expression de ce transporteur ($p < 0,05$) (Figure S9A). Par la suite, nos résultats montrent dans la lignée H292, une augmentation significative de l'expression d'OCT1 et 3 ($p < 0,01$ et $p < 0,0001$) lorsque l'expression de MUC1 est invalidée par une stratégie CRISPR/Cas9 (Figure S9B).

Ces différents résultats montrent que MUC1 intervient dans la modulation des transporteurs à influx du cisplatine. En effet, l'expression de MUC1 diminue significativement l'expression d'OCT1 dans la lignée PC9, de CTR1 dans la lignée H1975, d'OCT3 dans la lignée HCC827 et d'OCT1 et 3 dans la lignée H292. La diminution de l'influx du cisplatine et la diminution de son accumulation intracellulaire, sont des mécanismes associés à la chimiorésistance.

ii) *Les transporteurs à efflux spécifiques au cisplatine.*

Un autre mécanisme pouvant expliquer la diminution d'accumulation intracellulaire du cisplatine est l'efflux. En effet, le cisplatine est envoyé hors de la cellule par l'intermédiaire de transporteurs à efflux spécifiques au cisplatine tel que ATP7A et ATP7B. L'expression relative de ces deux transporteurs a été mesurée par RT-qPCR dans nos différents modèles cellulaires, afin de déterminer si MUC1 module l'efflux du cisplatine. Les résultats obtenus semblent montrer une augmentation d'expression d'ATP7A et montre une diminution d'expression d'ATP7B, dans la lignée PC9 exprimant stablement MUC1 (PC9+) (Figure 52A). Ensuite, nous montrons une diminution d'expression relative d'ATP7A et ATP7B dans la lignée H1975 exprimant MUC1 (H1975+) (Figure 52B). A l'inverse dans les lignées A549, HCC827 et H292, les résultats montrent une augmentation d'expression de ces deux transporteurs. En effet, dans la lignée A549+, l'expression d'ATP7A et ATP7B est augmentée de 70% ($p < 0,01$) et de 50% ($p < 0,05$), en

comparaison à la lignée A549 KO MUC1 (A549-) (Figure 52C). De même pour la lignée H292, nous montrons une corrélation positive entre l'expression de MUC1 et l'expression de ces transporteurs d'efflux : l'expression relative d'ATP7A est augmentée de 50% ($p < 0,05$) et l'expression relative d'ATP7B est augmentée de 35% ($p < 0,05$) dans les cellules H292+ (Figure S10B). Dans la lignée HCC827, les résultats semblent suivre les mêmes tendances (Figure S10A).

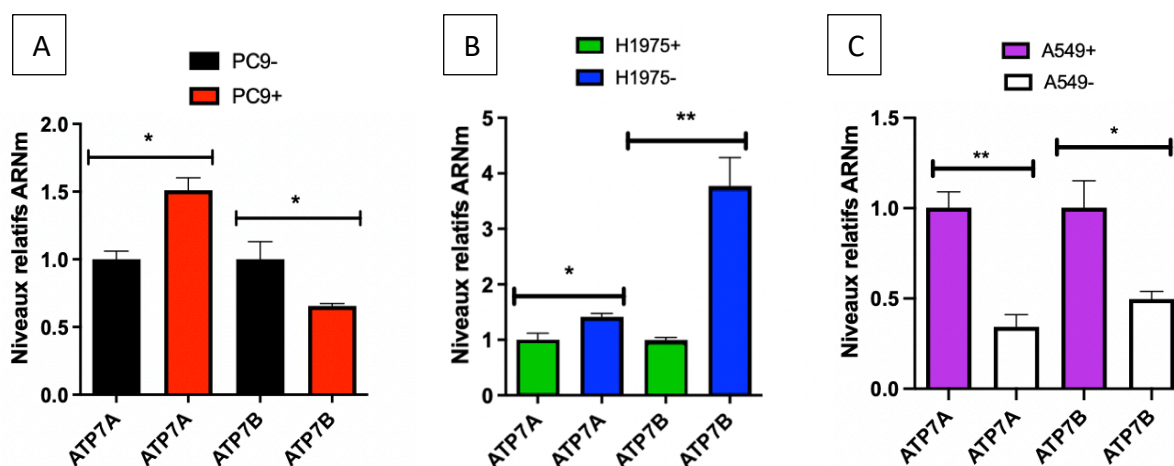


Figure 52 : MUC1 module l'expression relative des transports à efflux spécifique au cisplatine.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules PC9 (n=3) (A), H1975 (n=3) (B) et A549 (n=4) (C) exprimant ou non MUC1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En conclusion, nous montrons que l'expression de certains transporteurs à efflux du cisplatine est corrélée positivement avec l'expression de MUC1 (ATP7B dans les cellules PC9 et ATP7A et B dans les cellules A549), pouvant ainsi favoriser l'efflux du cisplatine hors de la cellule et potentiellement diminuer son accumulation intracellulaire.

iii) Les transporteurs à efflux à large spectre.

Un des mécanismes les plus connus dans l'acquisition de la chimiorésistance est la surexpression de pompes à efflux de la famille ABC. Cette famille regroupe un large nombre de protéines transmembranaires qui hydrolysent l'ATP en ADP, pour effluer les drogues. De plus, dans le cancer du pancréas, il a été montré que MUC1 induit la chimiorésistance à l'étoposide et à la gemcitabine, en régulant à la hausse l'expression de certains de ces transporteurs dont ABCB1 (Nath *et al.*, 2013). Dans ce contexte, nous avons voulu comparer l'expression de ces transporteurs dans nos lignées exprimant ou non MUC1. Nous avons focalisé notre attention sur certains membres de cette famille : ABCC1 à 6, ainsi qu'ABCB1 (connu sous le nom de glycoprotéine G) et ABCG2 (connu sous le nom de BRCP).

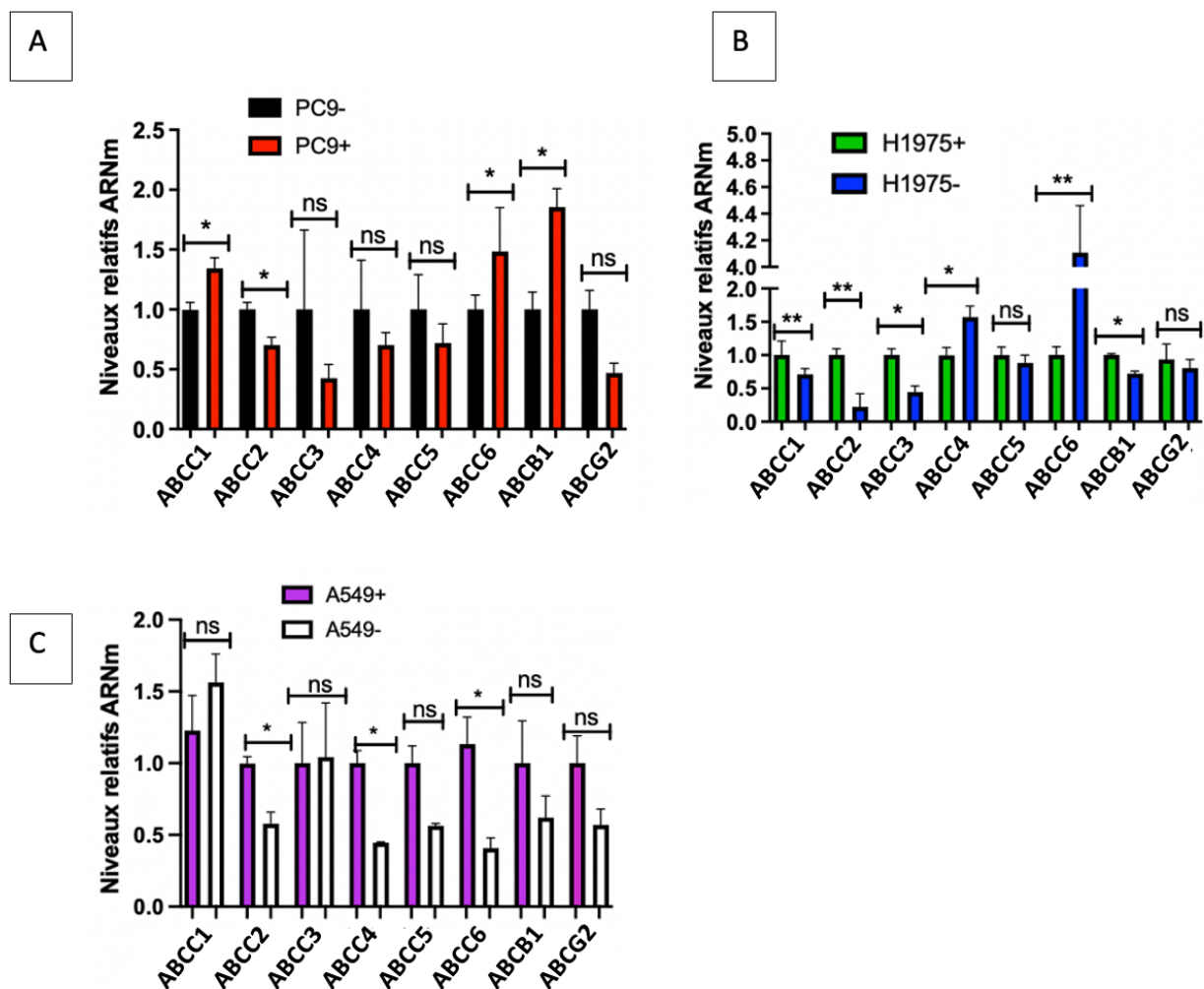


Figure 53 : MUC1 module l'expression relative des transporteurs de la famille ABC.

Expression relative des transporteurs ABCC1 à 6, ABCB1 et ABCG2 mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules PC9 (n=3) (A), H1975 (n=3) (B) et A549 (n=3) (C) exprimant ou non MUC1. * p<0,05 ; ** p<0,01.

Globalement, dans la lignée cellulaire PC9, nous remarquons que l'expression de ces différents transporteurs est augmentée dans le clone exprimant MUC1 (PC9+, en rouge) (Figure 53A). En effet, l'expression relative d'ABCC1 est augmentée de 30% (p<0,05), ABCC6 de 50% (p<0,01) et ABCB1 de 50% (p<0,05). Bien que la tendance soit à la baisse d'expression relative d'ABCG2 dans le clone exprimant MUC1 (PC9+), aucune différence significative n'est mise en évidence. Nous mettons en évidence, une diminution d'expression relative d'ABCC2 et d'ABCC4 et une tendance à la diminution d'ABCC5 dans le clone PC9+. Dans la lignée H1975, la tendance est également à la hausse d'expression relative de ces transporteurs dans le clone parental exprimant MUC1 (H1975+, en vert) (Figure 53B). En revanche, l'inactivation de MUC1 par une technique CRISPR/Cas9 permet de diminuer l'expression relative de ces transporteurs (H1975-, en bleu) : l'expression d'ABCC1 est diminuée de 30% (p<0,01), ABCC2 de 80%

($p < 0,05$), ABCC3 de 60% ($p < 0,05$), et ABCB1 de 20% ($p < 0,05$). Aucune différence significative d'expression n'a été mise en avant pour les pompes ABCC5 et ABCG2. Nous notons une augmentation d'expression relative d'ABCC4 et 6 (respectivement multipliée par 1,5 et par 4) dans le clone invalidé pour MUC1 (H1975-). Dans la lignée A549, la tendance globale d'expression de ces transporteurs à efflux est aussi à la hausse quand MUC1 est exprimée (A549+, en violet), favorisant ainsi l'efflux. L'invalidation de MUC1 (A549-, en blanc) diminue l'expression relative des transporteurs ABCC2 (50% ; $p < 0,05$), ABCC4 (55% ; $p < 0,05$) et ABCC6 (57% ; $p < 0,05$) (Figure 53C). Pour les transporteurs ABCC5, ABCB1 et ABCG2, la tendance est à la diminution d'expression relative dans les clones invalidés pour MUC1, bien qu'aucune différence significative ne soit mise en évidence. Des résultats similaires ont été relevés dans les lignées HCC827 (Figure S11A) et H292 (Figure S11B), avec une tendance globale à la hausse d'expression de ces transporteurs quand MUC1 est exprimée et une tendance à la diminution quand MUC1 est invalidée.

Dans un second temps et pour confirmer ces résultats, nous avons évalué d'un point de vue fonctionnel l'activité de ces pompes ABC. Pour cela, le kit EFLUXX ID Gold (Enzo®) a été utilisé. Ce kit repose sur une analyse en cytométrie en flux de la fluorescence des cellules traitées avec un composé perméable à la membrane. Une fois dans la cellule, ce composé est métabolisé en un composé fluorescent, qui est sorti de la cellule *via* les transporteurs ABC. Ainsi, la fluorescence intracellulaire mesurée est inversement proportionnelle à l'activité des pompes : moins il y a de fluorescence intracellulaire, plus le composé est efflué ; et inversement. L'auto-fluorescence basale, c'est-à-dire sans traitement avec le composé fluorescent, a été mesurée pour chacune des lignées et nous ne notons pas de différences significatives de fluorescence. Les résultats obtenus montrent pour la lignée PC9, une diminution de l'intensité de fluorescence intracellulaire mesurée quand MUC1 est surexprimée stablement et une augmentation de la fluorescence dans le clone n'exprimant pas MUC1 (PC9+ = $12\,320 \pm 680$ vs PC9- = $18\,851 \pm 1544$; $p < 0,05$) (Figure 54A). Dans la lignée A549, les résultats suivent la même tendance. L'expression de MUC1 est corrélée avec une diminution de l'intensité de fluorescence. L'invalidation de MUC1 est corrélée avec une augmentation de l'intensité de fluorescence (A549+ = $5\,427 \pm 108$ vs A549- = 6359 ± 185 ; $p < 0,01$) (Figure 54B). L'expression de MUC1 favorise donc l'efflux du composé et diminue son accumulation intracellulaire. L'invalidation de MUC1 diminue l'efflux du composé et favorise son accumulation intracellulaire.

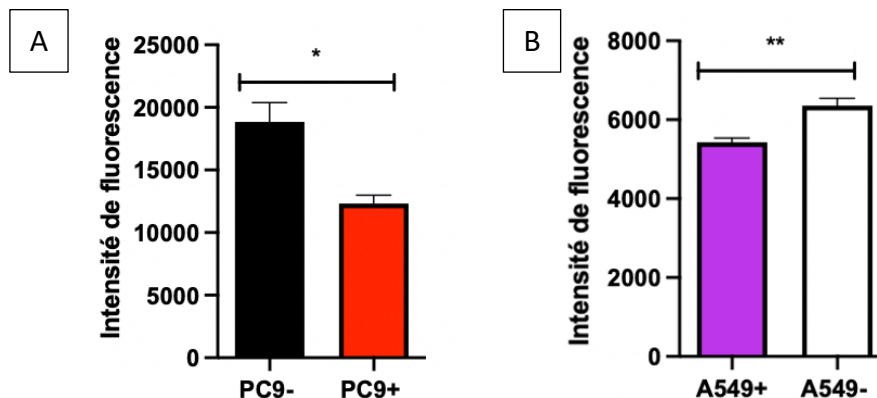


Figure 54 : Évaluation de l'activité des transporteurs à efflux de la famille ABC, par cytométrie en flux, au sein des lignées PC9 et A549, exprimant ou non MUC1.

Mesure de la fluorescence intracellulaire moyenne par cellule, dans les cellules PC9 (A) et A549 (B), exprimant ou non MUC1, après un traitement avec le composé fluorescent EFLUX Gold® (n=3). * p<0,05 et ** p<0,01.

Nos différents modèles exprimant ou non MUC1 montrent que **MUC1 module l'expression de certains transporteurs à efflux du cisplatine, dont les transporteurs de la famille ABC**. L'efflux augmenté, dans les différents modèles exprimant MUC1, pourrait diminuer l'accumulation intracellulaire du cisplatine et participer à la chimiorésistance. De manière intéressante, l'invalidation de MUC1 permet d'inverser ce phénomène.

iv) Acquisition du phénotype « cellule souche cancéreuse ».

Au cours des dernières décennies, de nombreuses équipes ont mis en évidence que l'acquisition du phénotype CSC favorisait la progression tumorale, la récurrence de la maladie mais aussi la résistance aux différentes thérapies. Le phénotype CSC est un état au cours duquel les cellules vont acquérir la pluripotence, impliqué dans la résistance, la rechute et la dissémination de la maladie. Les CSC sont retrouvées dans de nombreux types de tumeurs solides dont les tumeurs pulmonaires (Lopez-Ayllon *et al.*, 2014). Elles sont caractérisées par une expression accrue de certains facteurs de transcription dont OCT4, Nanog, SOX2 ou encore c-Myc impliqués dans la pluripotence (Huang *et al.*, 2020). Divers travaux ont permis de faire le lien entre phénotype CSC et résistance au cisplatine, dont ceux de Suresh *et al.*, en 2016. Après avoir rendu des cellules cancéreuses pulmonaires résistantes au cisplatine, ces cellules étaient largement positives à des marqueurs de cellules souches tels que CD133, ALDH (Aldehyde Dehydrogenase), ABCG2 mais aussi de SOX2 (Suresh *et al.*, 2016 ; Bora-Singhal *et al.*, 2015). Partant de ces observations, nous avons voulu voir si dans nos modèles cellulaires, l'acquisition du phénotype CSC pouvait être une explication à la chimiorésistance. Pour cela, l'expression de Nanog

et SOX2, deux facteurs de transcription surexprimés dans ces cellules souches cancéreuses, a été mesurée par RT-qPCR.

Les résultats obtenus montrent que l'expression relative de SOX2 est multipliée par 2,8 ($p < 0,05$) et que celle de Nanog est multipliée par 3,2 ($p < 0,01$) dans le clone PC9 exprimant MUC1 (PC9+), par rapport au clone parental n'exprimant pas MUC1 (PC9-) (Figure 55A). Pour les cellules H1975, les résultats suivent la même tendance : l'expression de MUC1 est corrélée avec une augmentation d'expression relative de Nanog et SOX2 (H1975+, en vert). L'inactivation de MUC1, permet de diminuer l'expression de ces deux facteurs de transcription (H1975-, en bleu) (de 30% pour SOX2 ; $p < 0,01$ et de 46% pour Nanog ; $p < 0,05$) (Figure 55B). Aucune différence significative n'est mise en évidence dans les clones A549 exprimant ou non MUC1, que ce soit pour Nanog ou SOX2 (Figure 55C). Pour la lignée H292, les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus pour les lignées PC9 et H1975 (Figure S12). Nous notons également une augmentation de 80% d'expression d'ABCG2 dans la lignée H292 + ($p < 0,05$) (Figure S11). Néanmoins, dans les lignées PC9, H1975 et A549, aucune différence significative de l'expression d'ABCG2, un transporteur ABC retrouvé au niveau des cellules souches, n'a été mise en évidence (Figure 53). Enfin, nous notons qu'OCT4 n'est pas exprimé au sein de nos différents modèles cellulaires.

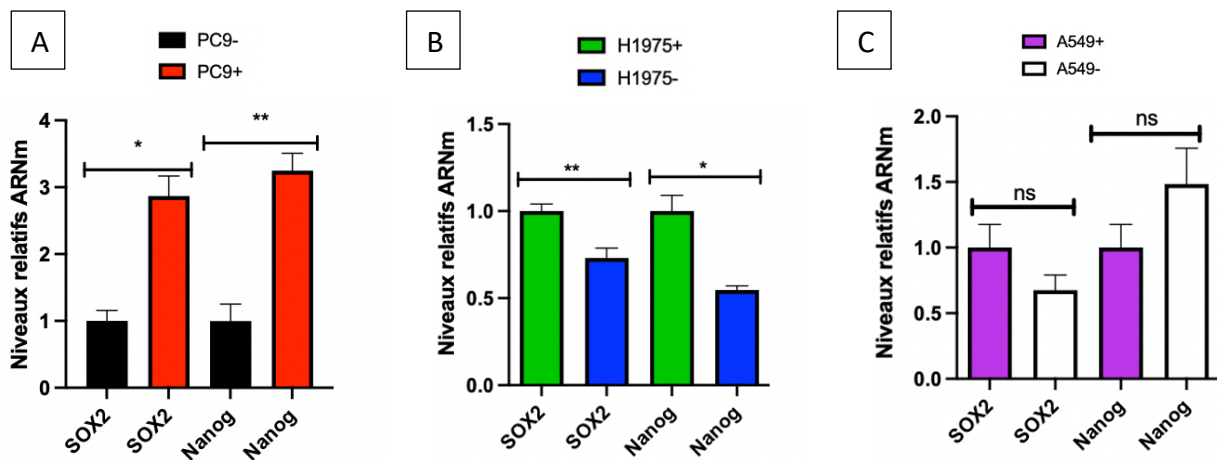


Figure 55 : MUC1 régule à la hausse l'expression relative de SOX2 et Nanog dans les cellules PC9 et H1975. Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules PC9 (n=3) (A), H1975 (n=3) (B) et A549 (n=3) (C) exprimant ou non MUC1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'expression de MUC1 est corrélée avec une augmentation d'expression de Nanog et SOX2 et suggèrent que MUC1 est impliquée dans l'acquisition du phénotype cellule souche cancéreuse. L'inactivation de MUC1 diminue l'expression de ces deux marqueurs et donc diminue le phénotype cellule souche cancéreuse.

Partie 3 : Ciblage de MUC1 par une stratégie oligonucléotide antisens de type GapmeR.

Dans les deux précédentes parties, nous montrons que MUC1 est une actrice de la progression tumorale mais aussi de la chimiorésistance au cisplatine, dans nos différents modèles cellulaires de CBNPC. Nous montrons, que l'invalidation de MUC1 par une technique CRISPR/Cas9 permet d'inverser ces phénomènes, en diminuant la progression tumorale et en chimiosensibilisant les cellules au cisplatine. Partant de ces observations et sachant que MUC1 est largement impliquée dans la cancérogenèse et est définie par le « National Institute of Cancer » comme le 2^{ème} antigène d'intérêt dans le cancer, elle représente donc une cible thérapeutique attrayante et potentielle en cancérologie. Différentes stratégies thérapeutiques ont été testées ou sont en cours d'essais pré-cliniques ou cliniques, comme des vaccins, des peptides inhibiteurs, des CAR-T/CAR-NK cells ou encore des anticorps monoclonaux. Or, aucune de ces stratégies n'est cliniquement utilisée à l'heure actuelle, notamment à cause de nombreux effets secondaires. C'est pourquoi, nous proposons une nouvelle approche pour cibler MUC1, différente de celles déjà testées et étudiées : le ciblage par un oligonucléotide antisens (ASO) de type GapmeR.

1) Généralités sur les GapmeR.

Les GapmeRs sont des ASO modifiés chimiquement. Ce sont des hétéroduplex ADN/ARN, composés d'une séquence ADN « Gap » flanquée d'extrémités ARN modifiées (Figure 56). Ils vont interagir par complémentarité avec l'ARNm cible et induire sa dégradation par recrutement de la RNase H, une endonucléase universelle capable de cliver la liaison phosphodiester d'une molécule ARN dans le contexte d'un complexe ADN/ARN (Figure 56) (Adachi *et al.*, 2021). Différentes modifications chimiques sur les nucléotides des ASO permettent d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques, leur affinité pour la cible ou encore leur stabilité. Les modifications les plus fréquentes sont l'ajout en 2' du ribose de groupements de type 2'-O-méthyl ou 2'-Fluoro ou encore la formation de pont intracaténaire de type méthylène entre le 2' et le 4' du ribose (cas des Locked Nucleic Acid ou LNA). En comparaison avec les autres modifications, les modifications de type LNA permettent d'augmenter l'affinité des ASO pour leur cible (Kurreck *et al.*, 2002). De par leur petite taille (15 à 30 nucléotides), leur distribution cellulaire peut se faire par gymnosis (GapmeR nu) (Stein *et al.*, 2010) ou *via* l'encapsulation dans des corps lipidiques (Adachi *et al.*, 2021). Enfin, les ASO peuvent être conjugués à divers molécules biologiques telles que des sucres, des acides nucléiques peptidiques ou encore des acides gras, afin d'améliorer le ciblage de certains organes (Adachi *et al.*, 2021).

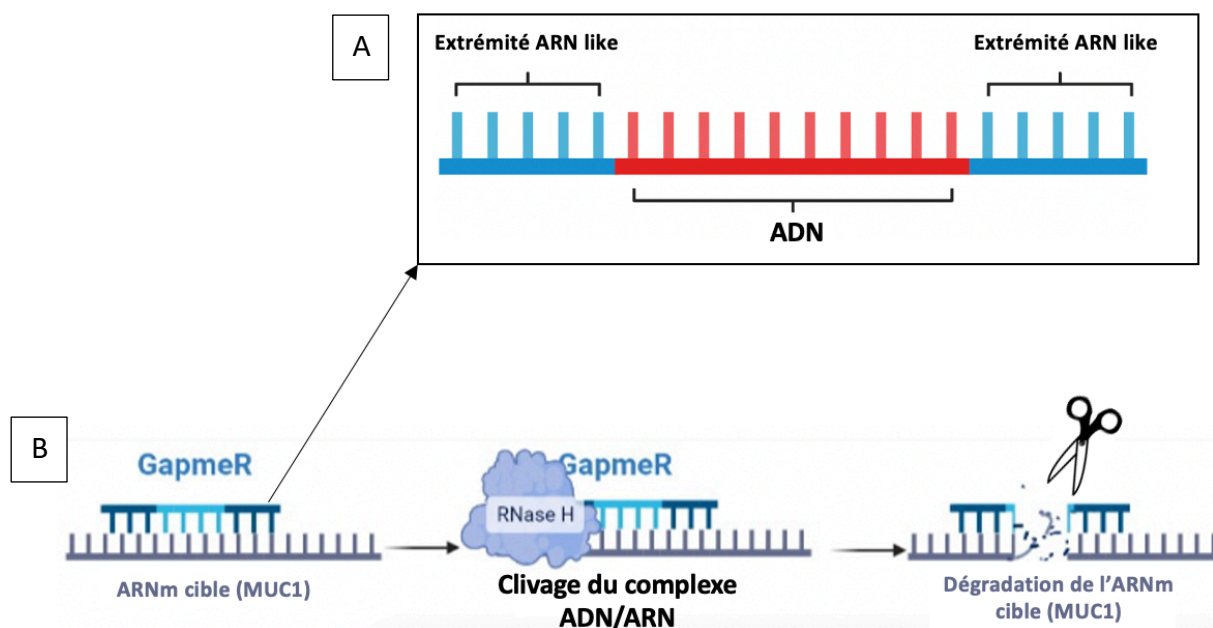


Figure 56 : Structure et mécanismes d'action du GapmeR.

Le GapmeR se lie spécifiquement à sa cible. Le recrutement de la RNase H induit le clivage du complexe ADN/ARN formé, conduisant à la dégradation du transcrit primaire dans le noyau, d'après Adachi *et al.*, 2021.

Les ASO sont en plein essor depuis l'approbation du Fomivirsén® en 1998 par la FDA. Depuis, l'intérêt pour ces molécules s'est renforcé et le nombre de publications sur les ASO est en constante augmentation. A ce jour, une dizaine d'ASO ont obtenu une approbation par la FDA, toutes pour des maladies rares et aucune dans le traitement du cancer. 8 essais cliniques sont en cours ou terminés selon le site « Clinical trials », aucun dans le cancer du poumon. Pourtant, les rares essais pré-cliniques ont montré des résultats plutôt encourageants dans le cancer du poumon (Leech *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 2021).

2) Validation de la stratégie ASO de type GapmeR pour cibler MUC1.

La première étape a été de tester différents GapmeRs (16 nucléotides de long, Qiagen®) et de sélectionner celui qui inhibe le mieux l'expression de MUC1. Les cellules H1975 exprimant MUC1, ont donc été transfectées soit par un GapmeR contrôle (Contrôle A et Contrôle B) soit par un GapmeR dirigé contre MUC1 (G1, G2, G3 et G4). L'expression de MUC1-C a été déterminée par western blot et nous voyons que le GapmeR permettant l'inhibition la plus importante est le GapmeR G4 (89% d'inhibition par rapport aux deux GapmeRs contrôles) (Figure 57). Cette inhibition semble aussi forte que celle obtenue avec le KO MUC1 (Figure 36). Par la suite, les expériences ont été faites avec ce GapmeR G4.

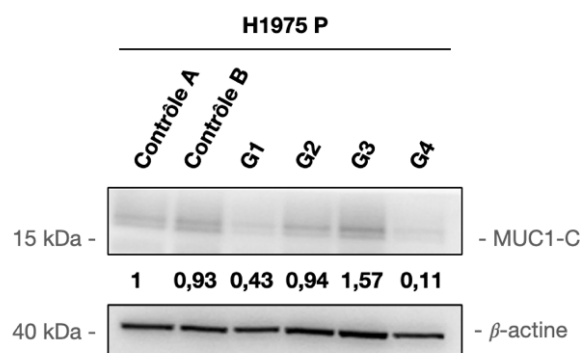


Figure 57 : Choix du GapmeR offrant la meilleure inhibition de MUC1.

L'expression de MUC1-C a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux, après transfection des cellules H1975 pendant 72h avec les différents GapmeR à tester. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge et pour la quantification *via* le logiciel Image J.

Après avoir choisi ce GapmeR, toutes nos lignées cellulaires exprimant MUC1 (H1975, A549, H292 et HCC827) ont été transfectées avec, afin de confirmer le bon ciblage de MUC1. Par Western Blot, les résultats montrent que le GapmeR G4 induit une diminution d'expression de MUC1-C au sein de nos différents modèles cellulaires, avec une inhibition de son expression de 25 à 68% selon les lignées (Figure 58).

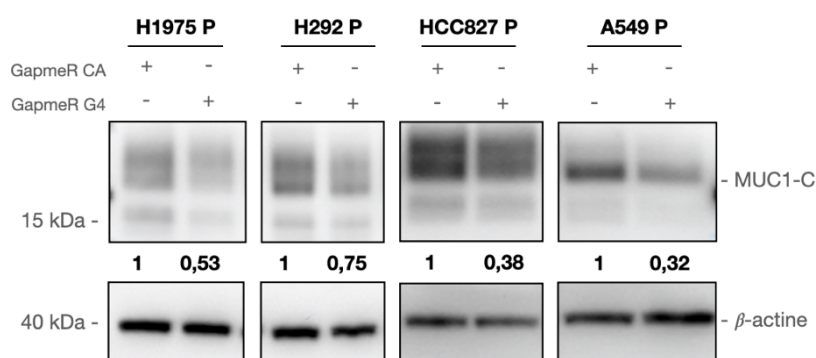


Figure 58 : Le GapmeR G4 cible MUC1 et induit une diminution de son expression au sein des différents modèles cellulaires de CBNPC.

L'expression de MUC1-C a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux, après transfection des cellules H1975, H292, HCC827 et A549 pendant 72h par le GapmeR contrôle A ou le GapmeR G4 ciblant MUC1. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge et pour la quantification *via* le logiciel Image J (n=3).

Après validation de la stratégie ASO dans nos différents modèles, nous avons voulu voir si le ciblage de MUC1 par un ASO permettait d'infléchir les propriétés cellulaires telles que la prolifération, la viabilité cellulaire, la migration, l'invasion et la clonogénicité, mais aussi les phénomènes de chimiorésistance au cisplatine.

3) Ciblage de MUC1 par un ASO et impact sur les propriétés cellulaires.

Les mêmes propriétés ont été étudiées que dans les modèles sur-exprimant MUC1 ou invalidés pour MUC1, et *via* les mêmes méthodes.

a) Impact sur la prolifération cellulaire.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur la prolifération cellulaire, puisque précédemment, nous avons montré que l'expression de MUC1 favorisait cette propriété.

Suite à un comptage sur cellule de Malassez, les résultats obtenus présentent tous la même tendance quel que soit la lignée considérée : le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 permet de diminuer la prolifération cellulaire (Figure 59A et C et Figure S13 A et B). Les différences les plus importantes sont visibles dans la lignée H292 (Figure S13B).

Ces résultats ont été confirmés par suivi de confluence du tapis cellulaire *via* la technologie Incucyte®. La confluence du tapis cellulaire est significativement inférieure dans les cellules H1975 transfectées avec le GapmeR G4 (H1975 G4, en orange) 54h après ensemencement, en comparaison avec les cellules H1975 transfectées avec le GapmeR contrôle A (H1975 CA, en bleu clair). Après 96h de suivi, la confluence totale de la condition H1975 G4 est de 32% contre 63% pour les H1975 CA ($p < 0,0001$) (Figure 59B). La même tendance est observable pour les cellules A549 transfectées avec le GapmeR ciblant MUC1 (A549 G4, en gris). En effet, 48h après ensemencement, une différence significative de la confluence du tapis cellulaire est mise en évidence. 96h après ensemencement, la confluence du tapis cellulaire est presque divisée par 2 quand MUC1 est ciblée par le GapmeR (84,46% pour A549 CA vs 44,39% pour A549 G4 ; $p < 0,0001$) (Figure 59D). Pour les lignées HCC827 et H292, les mêmes tendances sont observables, avec une diminution de la confluence du tapis cellulaire dans les lignées transfectées avec le GapmeR G4 par rapport aux lignées parentales transfectées avec le GapmeR contrôle (A 96h, H292 CA = 77,52% de confluence vs H292 G4 = 19,13%, $p < 0,0001$; HCC827 CA = 45,45% de confluence vs HCC827 G4 = 30,22%, $p < 0,0001$) (Figure S13B et S13D).

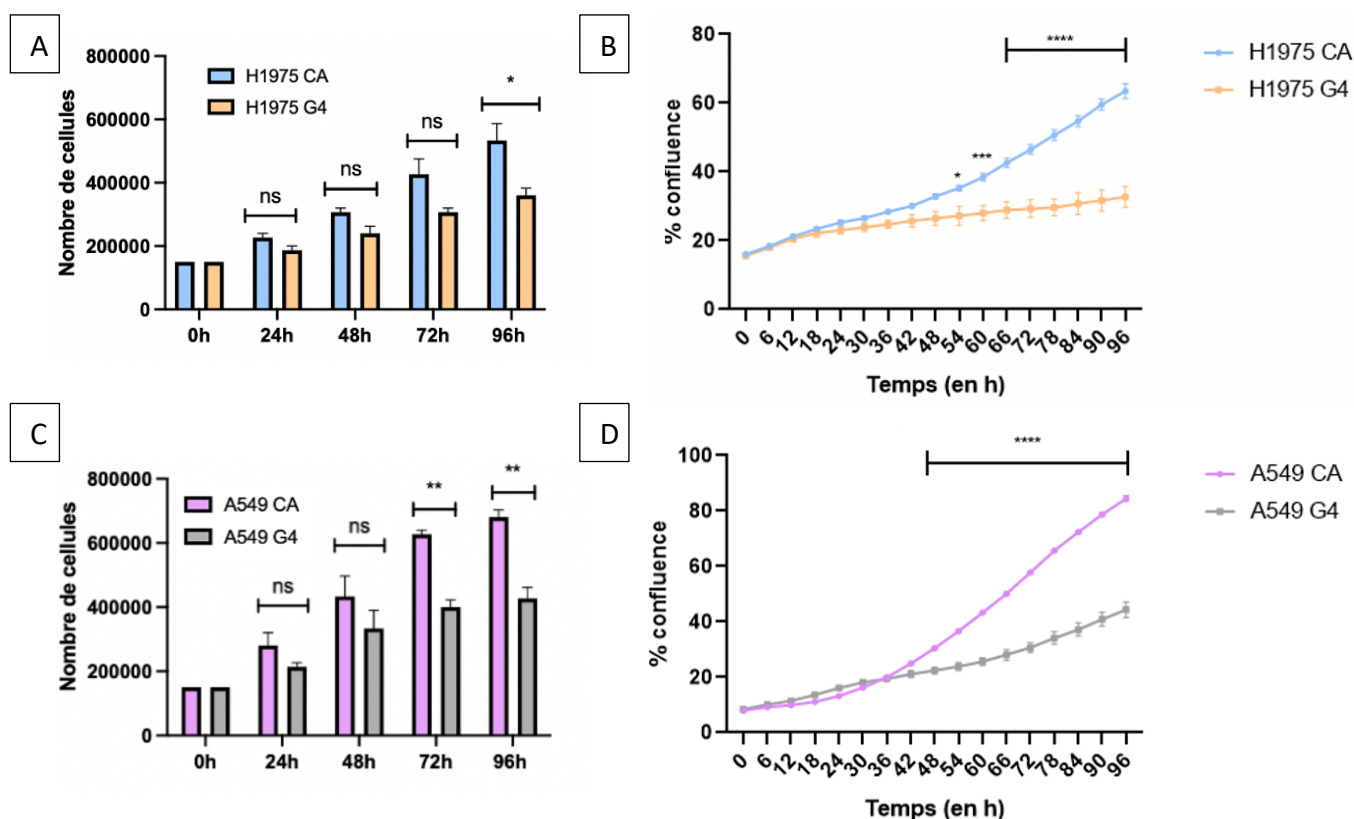


Figure 59 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue la prolifération cellulaire.

Après ensemencement à hauteur de 150 000 cellules par puits, les cellules H1975 (A) et A549 (C) ont été transfectées soit avec le GapmeR contrôle (CA) soit avec le GapmeR ciblant MUC1 (G4) et ont été comptées sur cellule de Malassez toutes les 24h, pendant 4 jours (n=3). Après ensemencement à hauteur de 25 000 cellules par puits et transfection avec le GapmeR contrôle CA ou le GapmeR ciblant MUC1 G4, la confluence du tapis cellulaire a été suivie grâce à la technologie Incucyte® avec prise de photos toutes les 6 heures pendant 4 jours, pour les cellules H1975 (B) et A549 (D) (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; **** p<0,0001

De plus, un suivi du marquage au Ki-67 par immunofluorescence a été réalisé, suivi d'un dénombrement des cellules positives à ce marquage. Les résultats obtenus montrent une diminution du nombre de cellules marquées au Ki-67 de 13%, dans les cellules H1975 G4 en comparaison aux cellules H1975 CA (H1975 G4 = 56,07% ± 5,56 vs H1975 CA = 69,05 ± 2,76 ; p<0,05) (Figure 60A). Les résultats obtenus pour la lignée A549 sont similaires. Le ciblage de MUC1 par le GapmeR diminue de 15% le nombre de cellules marquées positivement au Ki-67 (A549 CA = 81,76% ± 2,98 vs A549 G4 = 71,91% ± 3,68 ; p<0,05) (Figure 60B).

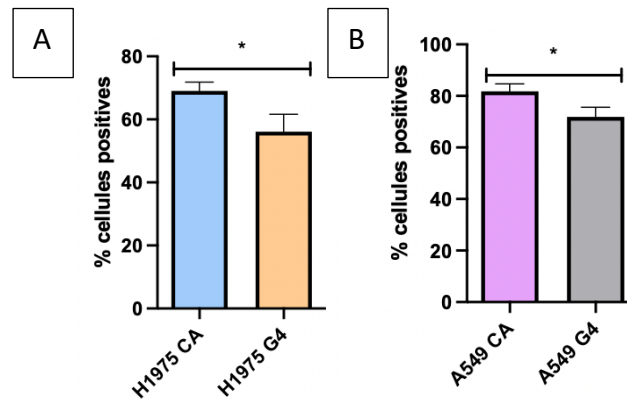


Figure 60 : Le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 diminue le marquage Ki-67.

Évaluation du pourcentage de cellules positives au marquage Ki-67, par immunofluorescence sur lame au sein des cellules H1975 (A) et des cellules A549 (B), après transfection par un GapmeR contrôle CA ou ciblant MUC1 G4 (n=3). * p<0,05

Précédemment, nous avons mis en évidence que MUC1 induit l'activation de différentes voies de signalisation associées à la prolifération et à la survie dont la voie MAPK. Par Western Blot, nous avons étudié l'expression de différentes protéines impliquées dans la voie MAPK et la voie PI3K/AKT. Les résultats obtenus concernant la phosphorylation d'AKT ne montrent pas de différences entre la condition contrôle CA et le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4. En revanche, le ciblage de MUC1 diminue de 53% la phosphorylation de Erk 1/2, favorable à une diminution d'activation de la voie MAPK et une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, l'expression de p21 au sein des cellules H1975 transfectées par le GapmeR G4 est multipliée par deux, en comparaison avec les cellules H1975 transfectées par le contrôle CA (Figure 61). Le ciblage de MUC1 par le GapmeR favorise, donc, un arrêt du cycle cellulaire et diminue l'activation de voies impliquées dans la prolifération.

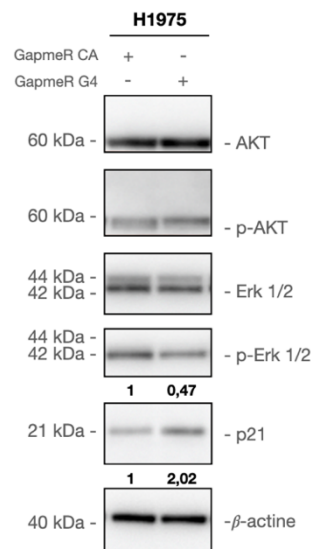


Figure 61 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR favorise un arrêt du cycle cellulaire et diminue la prolifération.

L'expression de AKT et Erk 1/2 ainsi que leur phosphorylation respective et p21 a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux. La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge ainsi que pour la quantification, *via* le logiciel ImageJ.

En conclusion, le ciblage de MUC1 par un GapmeR favorise un arrêt du cycle cellulaire par accumulation de p21 et diminue la prolifération cellulaire en diminuant l'activation de certaines de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie, comme la voie MAPK. De manière intéressante, le ciblage de MUC1 reproduit les mêmes résultats que ceux obtenus avec les lignées KO MUC1 par CRISPR/Cas9.

b) Impact sur la viabilité cellulaire.

Dans un second temps, l'impact du ciblage de MUC1 sur la viabilité cellulaire a été étudié, car dans la précédente partie, nous montrons que l'expression de MUC1 favorise la viabilité et ceci dans tous nos modèles cellulaires.

Les résultats montrent que, peu importe la lignée, le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 diminue la viabilité cellulaire. En effet, dans la lignée H1975 G4, la viabilité est globalement diminuée et ceci de manière significative dès 48h ($p<0,01$) et jusqu'à la fin de l'expérience à 96h ($p<0,05$) (Figure 62A). La même tendance est globalement observable dans la lignée A549, avec une diminution significative de la viabilité à 24h ($p<0,01$) et à 48h ($p<0,05$) (Figure 62B). Dans les lignées HCC827 (Figure S14A) et H292 (Figure S14B), la viabilité est également diminuée significativement quand MUC1 est ciblée par le GapmeR G4 et les différences sont nettement plus importantes dans la lignée H292 à 72h ($p<0,01$) et à 96h ($p<0,0001$).

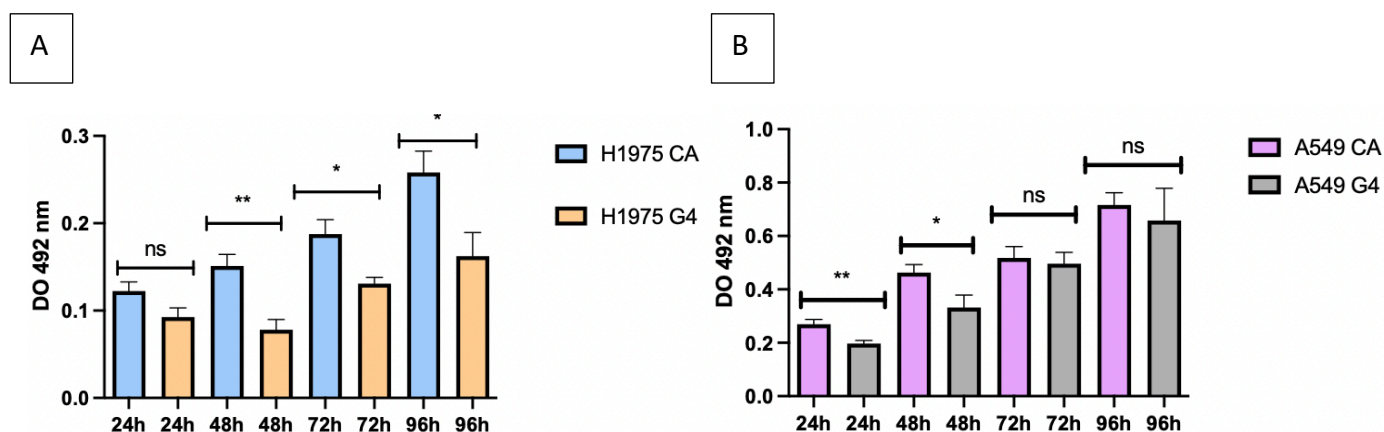


Figure 62 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue la viabilité cellulaire.

Test de viabilité (MTS) réalisé à 24, 48, 72 et 96h après ensemencement et transfection des cellules (A) H1975, et (B) A549 (n=3). * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

En conclusion, le ciblage de MUC1 permet de diminuer la viabilité cellulaire.

c) Impact sur la migration et invasion.

i) La migration

Précédemment, nous avons mis en évidence que l'expression de MUC1 favorise les propriétés migratoires des cellules cancéreuses pulmonaires. Les mêmes expériences ont été reproduites sur les lignées H1975, A549, HCC827 et H292 après transfection par le GapmeR contrôle (CA) ou par le GapmeR ciblant MUC1 (G4).

Les résultats obtenus lors d'un test de blessure sur tapis cellulaire confluent après un traitement à la mitomycine C, montrent que la fermeture de la blessure est moins rapide dans les cellules H1975 G4 (38% de confluence) que dans les cellules H1975 CA (47% de confluence) et ceci dès 48h ($p<0,05$). Après 72h de suivi, la blessure est refermée à 58% contre 38% quand MUC1 est ciblée par le GapmeR G4 (Figure 63A). La même tendance est observable dans la lignée A549. Le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 diminue la fermeture de la blessure dès 40h ($p<0,05$). Après 72h de suivi, ce résultat est confirmé : en effet, la blessure est refermée à 84% pour les A549 CA contre 60% pour les A549 G4 ($p<0,01$) (Figure 63B). Pour les lignées HCC827 et H292, la même tendance est observable, avec des différences plus importantes dans la lignée H292. Effectivement, une différence dans la vitesse de fermeture de la blessure est observable des 4h après la blessure. 12h après le début du suivi, cette blessure n'est refermée qu'à 45% dans les cellules H292 G4 contre 100% pour les cellules H292 CA ($p<0,0001$) (Figure S15B). Pour les cellules HCC827, la diminution de migration des cellules HCC827 G4 est observable significativement 22h après le début du suivi et jusqu'à la fin de l'expérience (Figure S15A).

Ces résultats ont également été confirmés par des tests de migration en chambre de Boyden. Les résultats obtenus montrent que le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 diminue les capacités de migration. En effet, la migration est diminuée de 33% pour les cellules H1975 G4 ($p<0,05$; Figure 63C), de 29% pour les cellules A549 G4 ($p<0,05$; Figure 63D), de 38% pour les HCC827 G4 ($p<0,0001$; Figure S15C) et de 38%, également, pour les cellules H292 transfectées par le GapmeR G4 ciblant MUC1 ($p<0,01$; Figure S15D). De plus, ces résultats se rapprochent de ceux obtenus lors de l'inactivation de MUC1 par une technique CRISPR/Cas9 (Figure 41 et S4).

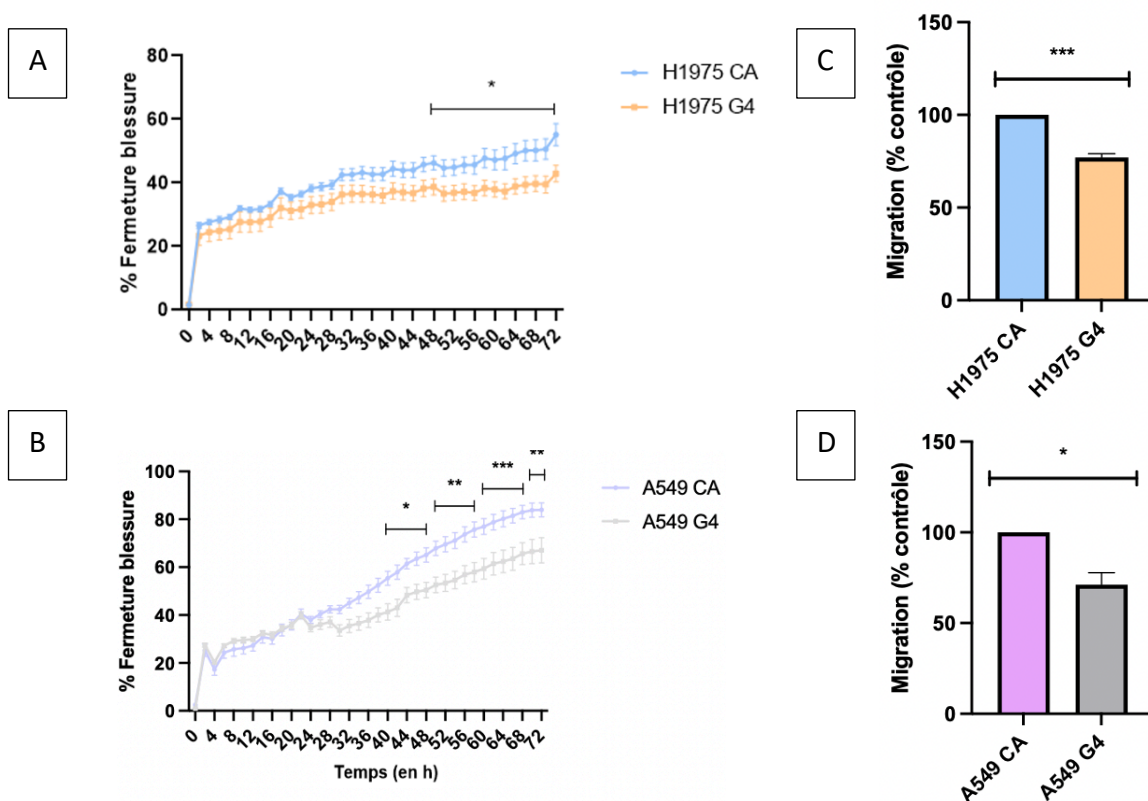


Figure 63 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue les propriétés migratoires.

Mesure de la confluence relative de la blessure standardisée réalisée à l'aide du WoundMarker (Essen Bioscience) dans les cellules H1975 (A) et A549 (B) après transfection par le GapmeR CA ou G4 (n=3). Détermination des capacités migratoires des H1975 (C) et A549 (D) par l'intermédiaire de chambres de Boyden. 24h après l'ensemencement, les cellules ayant migré ont été lysées, colorées et la fluorescence émise mesurée. La fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules ayant migré. Les résultats ont été normalisés par rapport à la lignée parentale transfectées par le GapmeR contrôle CA (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001.

Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue les capacités migratoires des cellules cancéreuses pulmonaires.

ii) L'invasion.

Nous montrons également dans la partie précédente que MUC1 favorise l'invasion. C'est pourquoi, les capacités invasives ont été déterminées dans les lignées cancéreuses pulmonaires après transfection par le GapmeR contrôle CA ou le GapmeR ciblant MUC1 G4.

Le ciblage de MUC1 dans la lignée H1975 diminue la capacité invasive des cellules de 34% par rapport aux cellules H1975 transfectées par le GapmeR contrôle CA (p<0,05 ; Figure 64A). Des résultats

similaires sont obtenus pour la lignée A549. En effet, le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 diminue l'invasion des cellules de 24% par rapport à la condition contrôle A549 CA ($p < 0,0001$; Figure 64B). De la même manière, le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 dans les lignées HCC827 et H292, diminue l'invasion des cellules, respectivement de 42% ($p < 0,01$; Figure S16A) et de 30% ($p < 0,0001$; Figure S16B), par rapport aux lignées parentales transfectées avec le GapmeR contrôle A.

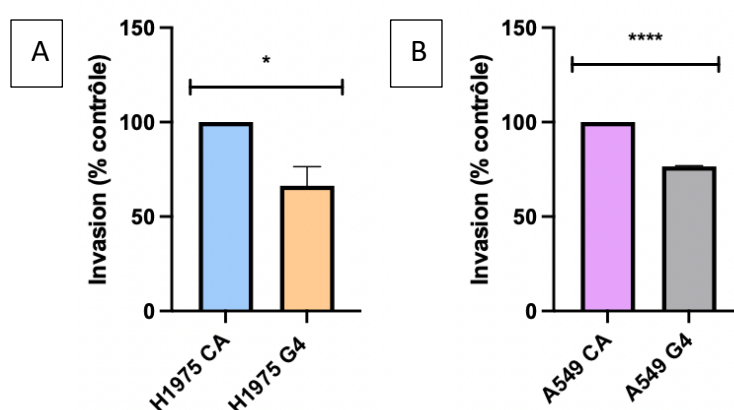


Figure 64 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue les capacités invasives.

Mesure des capacités invasives des cellules H1975 (A), et A549 (B) transfectées par un GapmeR contrôle ou ciblant MUC1 par l'intermédiaire de chambres de Boyden recouverte de matrigel. 24h après l'ensemencement, les cellules ayant envahi la membrane sont colorées et lysées. La fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules ayant dégradés le matrigel et ayant migrés vers le compartiment enrichi en SVF. Les résultats sont normalisés par rapport à la lignée parentale transfectées avec le GapmeR contrôle CA ($n=3$). * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue le caractère invasif des lignées cellulaires de CBNPC.

d) Impact sur la formation de colonies.

Après avoir montré que l'expression de MUC1 au sein de nos différents modèles cellulaires favorisent la capacité à former des colonies, nous avons voulu déterminer si son ciblage par un ASO diminuait cette capacité.

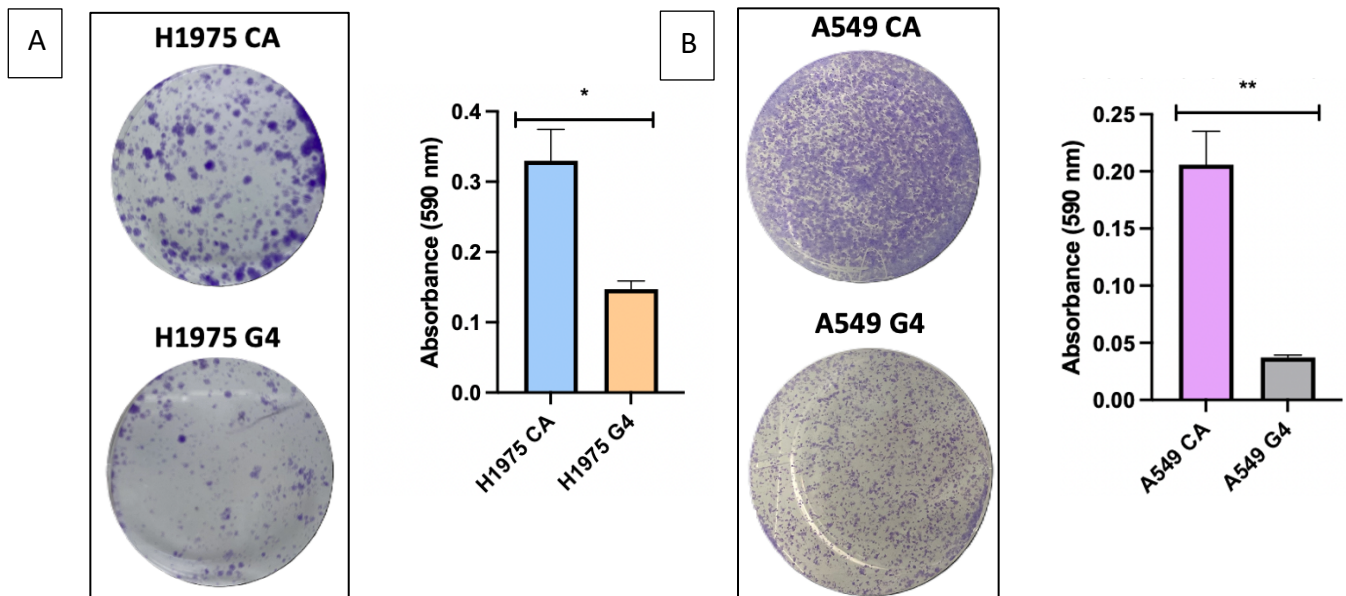


Figure 65 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue le nombre de colonies formées dans les cellules H1975 et A549.

Test de clonogénicité réalisé sur les cellules H1975 (A) et A549 (B)ensemencées à faible densité (1000 cellules/puits), après transfection par le GapmeR contrôle (CA) ou le GapmeR ciblant MUC1 (G4) à J0 et à J7. Les colonies ont été colorées avec du crystal violet 14 jours après l'ensemencement. Une quantification du crystal violet fixé a été réalisée, après extraction. L'absorbance mesurée à 590 nm est proportionnelle aux nombres de colonies formées (n=3). *p<0,05 ; ** p<0,01.

De manière empirique, les résultats montrent moins de clones formés lorsque MUC1 est ciblée par le GapmeR G4 dans nos différentes lignées. L'extraction du crystal violet et la mesure de l'absorbance confirment ces observations. En effet, l'absorbance mesurée est divisée par 2 pour les H1975 G4 (p<0,05 ; Figure 65A), par 4 pour les A549 G4 (p<0,01 ; Figure 65B), par 3 pour les HCC827 G4 (p<0,05 ; Figure S17A) et par 1,5 pour les H292 G4 (p<0,05 ; Figure S17B). L'absorbance mesurée étant proportionnelle au nombre de colonies, **nous pouvons conclure que le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue la capacité à former des clones à partir d'une cellule unique.**

e) Impact sur l'apoptose.

Après avoir montré que l'expression de MUC1 au sein des lignées PC9, H1975 et A549 protégeait de l'apoptose, nous avons voulu vérifier si son ciblage rendait les cellules sujettes à l'apoptose, d'un point de vu basal en absence de traitement. Par Western Blot, l'expression de Parp1 et de sa forme clivée ainsi que l'expression de la caspase 3 clivée ont été étudiées dans la lignée H1975. Nous montrons une augmentation d'expression de la forme clivée de Parp1 dans la lignée H1975 transfectées par le GapmeR G4 ciblant MUC1. En revanche, aucun clivage de la caspase 3 n'a été mis en évidence.

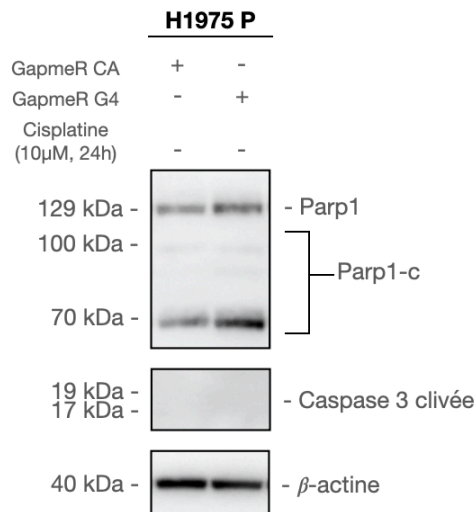


Figure 66: Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR sensibilise les cellules H1975 à l'apoptose.

L'expression de Parp1, Parp1-c et Caspase 3-c a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge (n=3).

Ces résultats suggèrent qu'en absence d'un traitement inducteur de mort, les cellules ciblées par le GapmeR G4 sont plus sujettes à l'apoptose que les cellules transfectées par le GapmeR contrôle CA.

Bien que MUC1 soit une inductrice de la progression tumorale en favorisant la prolifération, la viabilité cellulaire, la migration et l'invasion, la capacité à former des clones et en protégeant de la mort cellulaire, son ciblage par un ASO de type GapmeR diminue de manière importante toutes ces propriétés et permet de diminuer la progression tumorale *in vitro*.

4) Ciblage de MUC1 et impact sur la chimiorésistance au cisplatine.

Dans la partie précédente, nous montrons que l'expression de MUC1 induit la résistance au cisplatine et ceci dans tous nos modèles cellulaires de CBNPC. Son invalidation par CRISPR/Cas9 permet de sensibiliser les cellules au cisplatine. Partant de ces observations, nous avons voulu déterminer si le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR permettait de sensibiliser les cellules au cisplatine. Pour cela, les cellules H1975 et A549 ont été transfectées soit par le GapmeR ciblant MUC1 G4 soit par le GapmeR contrôle CA. Après traitement avec des doses croissantes de cisplatine, allant de 0 jusqu'à 200µM, les IC50 respectives à chaque lignée et conditions ont été déterminées, *via* des tests MTS.

Le ciblage de MUC1 par un ASO permet de sensibiliser les cellules au cisplatine (H1975 $p < 0,001$; A549 $p < 0,05$). De manière intéressante, les valeurs d'IC₅₀ obtenus pour les lignées H1975 CA et A549 CA sont similaires à celles des lignées parentales respectives (Tableau 4) et celles obtenus pour les conditions H1975 G4 et A549 G4 sont proches de celles des lignées H1975- et A549- (KO MUC1) (Tableau 5 et Figure 67).

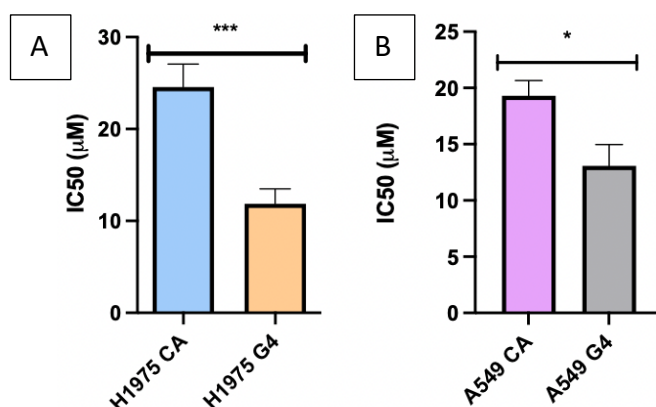


Tableau 5 :

Lignée cellulaire	IC ₅₀ (μM) MUC1 +	IC ₅₀ (μM) MUC1 -	IC ₅₀ (μM) CA (GapmeR Controle)	IC ₅₀ (μM) G4 (GapmeR MUC1)
H1975	23,93 ± 1,13	10,74 ± 0,56	24,56 ± 2,49	11,86 ± 1,64
A549	20,80 ± 1,58	13,36 ± 1,87	19,31 ± 1,35	13,07 ± 1,90

Figure 67 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR sensibilise les cellules H1975 et A549 au cisplatine. 24h après ensemencement et transfection, les cellules H1975 (A) et A549 (B) ont été traitées avec des doses croissantes de cisplatine (0 à 200 μM). 72h après traitement au cisplatine, un test MTS a été réalisé afin de déterminer les IC₅₀ respectives à chacune des lignées (Tableau 5). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR permet de sensibiliser les cellules au cisplatine et les valeurs d'IC₅₀ sont similaires à celles obtenues lors de l'inactivation de MUC1.

Dans la partie précédente, afin de comprendre quels étaient les mécanismes mis en place par MUC1 pour induire la chimiorésistance au cisplatine, nous avons étudié son impact sur les différentes étapes du mode d'action du cisplatine. Nous avons procédé de la même manière dans cette partie, afin de mettre en évidence l'impact du ciblage de MUC1 dans le mode d'action du cisplatine.

a) Impact sur les dommages à l'ADN.

Après avoir mis en évidence le rôle de MUC1 dans la résistance au cisplatine, nous avons montré que MUC1 diminuait la quantité de dommages à l'ADN normalement induits par le cisplatine.

Ici, les dommages à l'ADN seront également étudiés par western blot, immunofluorescence et par des essais comètes, mais sur les H1975 et A549 transfectées par le GapmeR contrôle ou ciblant MUC1.

Par western blot, les expressions de 53BP1 et du variant γ H2AX ont été déterminées, uniquement pour la lignée H1975. Nous mettons en évidence, une augmentation d'expression d'environ 4 fois de ces deux marqueurs de cassures doubles brins, lorsque MUC1 est ciblée par le GapmeR G4 (Figure 68A).

Ces résultats ont été confirmés par immunofluorescence et dénombrement des foci γ H2AX (Figure 68B et C) et p-ATM (Figure S18) induit par un traitement au cisplatine. La condition non traitée au cisplatine pendant 24h a été utilisée comme contrôle et nous permet de confirmer que le cisplatine induit des dommages à l'ADN. Après un traitement cisplatine à 10 μ M pour les cellules H1975 et 14 μ M pour les cellules A549 pendant 24h, le ciblage de MUC1 par le GapmeR G4 induit une augmentation du nombre de foci γ H2AX dans les 2 lignées étudiées (H1975 CA CDDP = 4,075 foci/cellule $\pm$ 0,39 vs H1975 G4 CDDP = 6,47 foci/cellule $\pm$ 0,48 ; $p < 0,001$; A549 CA CDDP = 3,29 foci/cellule $\pm$ 0,21 vs A549 G4 CDDP = 4,01 foci/cellule $\pm$ 0,33 ; $p < 0,05$) (Figure 68B et C). Les résultats obtenus pour le dénombrement des foci p-ATM montrent des allures similaires, avec une augmentation du nombre de foci quand MUC1 est ciblée par le GapmeR G4 dans les deux lignées (H1975 CA CDDP = 3,13 foci/cellule $\pm$ 0,17 vs H1975 G4 CDDP = 5,38 foci/cellule $\pm$ 0,49 ; $p < 0,0001$; A549 CA CDDP = 2,70 foci/cellule $\pm$ 0,11 vs A549 G4 CDDP = 4,78 foci/cellule $\pm$ 0,23 ; $p < 0,0001$) (Figure S18).

Enfin, des essais comètes ont été réalisés sur les lignées H1975 et A549 transfectées par le GapmeR contrôle CA ou ciblant MUC1 G4, après traitement au cisplatine. De manière empirique, les résultats montrent une augmentation de la longueur des queues des comètes lorsque MUC1 est ciblée par le GapmeR G4, et ceci dans les deux lignées (Figure 69D et E). La détermination du « tail moment » (Longueur queue x intensité fluorescence totale) a permis de confirmer nos observations. En effet, les cellules H1975 et A549 transfectées par le GapmeR ciblant MUC1 G4 présentent des « tails moments » supérieurs aux conditions H1975 et A549 contrôle CA (H1975 CA = 71, 56 $\pm$ 4,05 vs H1975 G4 = 99,01 $\pm$ 3,42 ; $p < 0,0001$; A549 CA = 48,25 $\pm$ 2,00 vs A549 G4 = 58,33 $\pm$ 1,70 ; $p < 0,001$) (Figure 68F et G).

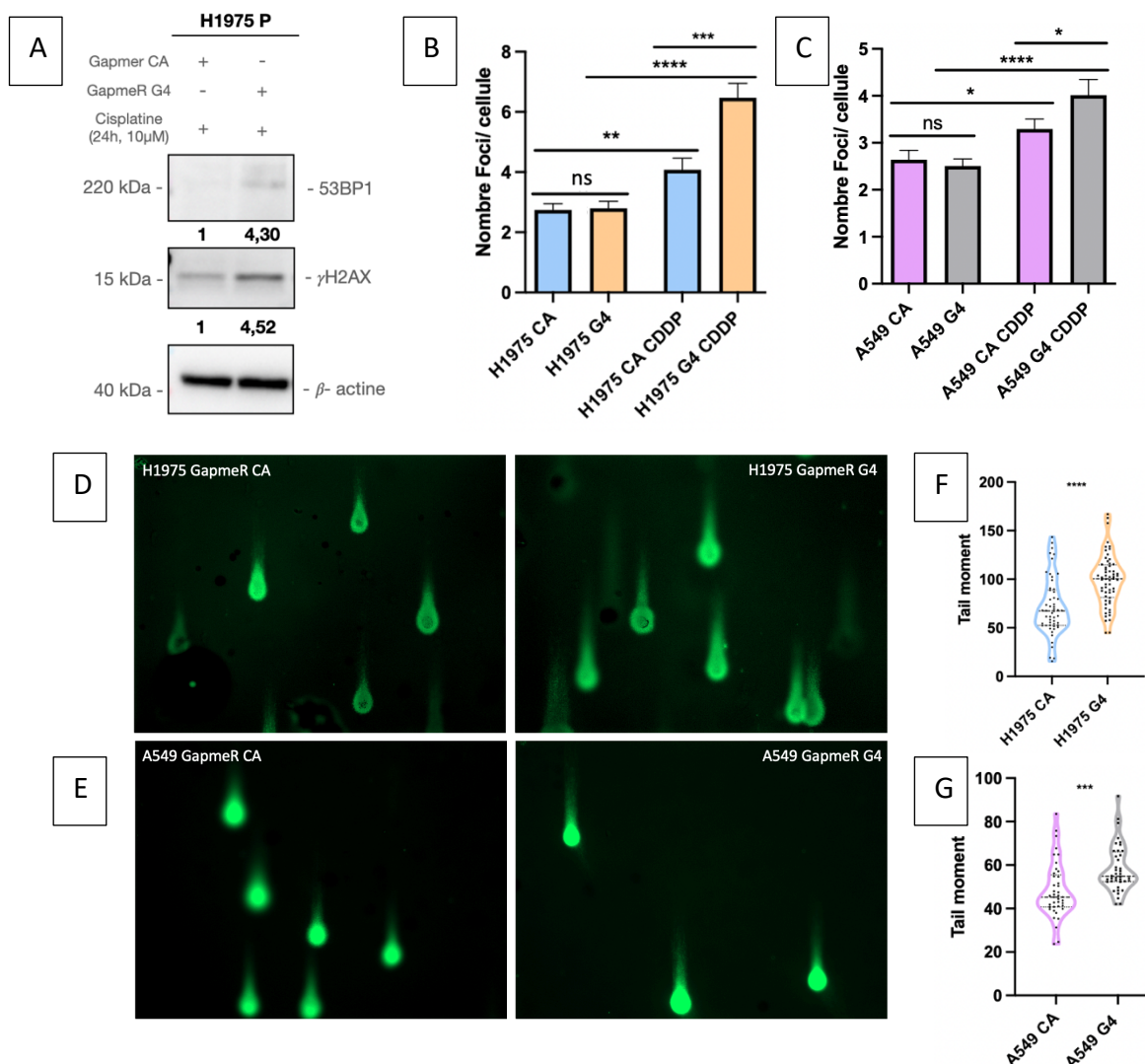


Figure 68 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR augmente le nombre de dommages à l'ADN induit par le cisplatine.

L'expression de γH2AX et 53BP1 a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux, après un traitement au cisplatine 10μM pendant 24h. La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge (A). Dénombrement des foci γH2AX par immunofluorescence sur lame après traitement ou non au cisplatine (CDDP) 10 μM pendant 24h, dans les lignées H1975 (B) et A549 (C) transfectées par le GapmeR contrôle CA ou ciblant MUC1 G4 (n=3). Essais comètes réalisés sur les lignées H1975 (D) et A549 (E) transfectées par le GapmeR contrôle CA ou ciblant MUC1 G4 et après un traitement au cisplatine 10μM pendant 24h. Le tail moment (longueur queue x intensité fluorescence totale) a été déterminé pour chaque lignée, H1975 (F) et A549 (G). Sa valeur est proportionnelle à la quantité de dommages à l'ADN générés par le traitement au cisplatine (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001.

L'ensemble de ces résultats montrent que le ciblage de MUC1, par un ASO de type GapmeR, augmente la quantité de dommages à l'ADN générés par le cisplatine au sein de nos différents modèles d'adénocarcinomes pulmonaires.

b) Impact sur le cycle cellulaire.

En plus de protéger des dommages à l'ADN générés par le cisplatine, nous montrons que l'expression de MUC1, dans nos différents modèles cellulaires, protège d'un arrêt du cycle cellulaire, normalement induit par l'accumulation des dommages à l'ADN. L'objectif, dans cette partie, est de vérifier si le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR présente un effet sur le cycle cellulaire.

Par western blot, nous montrons que le ciblage de MUC1 par le GapmeR dans la lignée H1975 après traitement au cisplatine, augmente de 3 fois l'expression de p21 (Figure 69A). Pour conforter ces résultats, la prolifération cellulaire a été étudiée par suivi du marquage Ki-67, dans nos différents modèles cellulaires avec et sans traitement au cisplatine. La condition non traitée sert de contrôle. Ces résultats montrent une diminution de 18% du nombre de cellules marquées positivement au Ki-67, lorsque MUC1 est ciblée par un ASO de type GapmeR, dans la lignée H1975 (H1975 CA CDDP = 67,20% $\pm$ 5,14 vs H1975 G4 CDDP = 49,24% $\pm$ 4,72 ; $p < 0,05$) (Figure 69B). Ces observations sont valables également pour la lignée A549 G4, avec des différences encore plus importantes. En effet, entre la condition A549 CA et la condition A549 G4, le nombre de cellules positives au Ki-67 est diminué de 38% (A549 CA CDDP = 74,02% $\pm$ 4,49 vs A549 G4 CDDP = 46,40% $\pm$ 3,21 ; $p < 0,0001$) (Figure 69C).

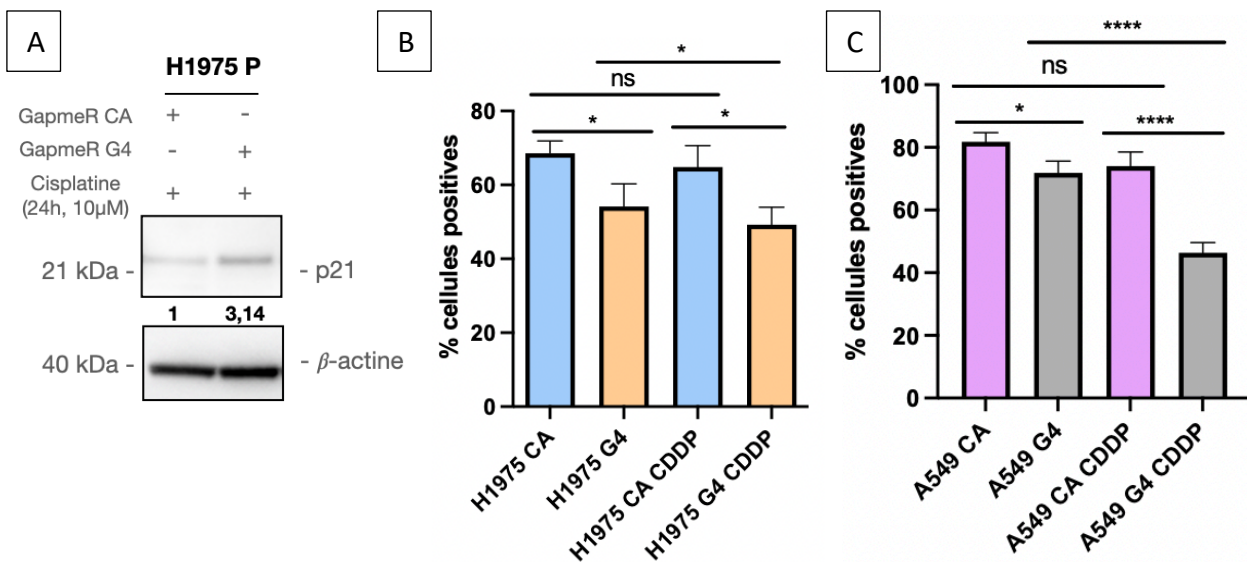


Figure 69 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR favorise l'arrêt du cycle cellulaire et diminue le caractère prolifératif.

L'expression de p21 a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux, après traitement au cisplatine 10 μ M pendant 24h. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge (n=3) (A). Évaluation du pourcentage de cellules positives au marquage Ki-67, après traitement cisplatine 10 μ M (CDDP) pendant 24h, par immunofluorescence sur lame dans les cellules H1975 (B) et A549 (C) transfectées par le GapmeR contrôle CA ou ciblant MUC1 G4 (n=3). La condition non traitée est utilisée comme contrôle. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

En conclusion, nous montrons que la **stratégie ASO de type GapmeR ciblant MUC1 favorise l'arrêt du cycle cellulaire et diminue le caractère prolifératif, après un traitement au cisplatine.**

c) Impact sur le processus apoptotique.

Précédemment, nous montrons que malgré un traitement au cisplatine, l'expression MUC1 protège les lignées cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires de l'apoptose. Ici, nous voulons voir quel est l'impact sur le processus apoptotique du ciblage de MUC1 par notre stratégie ASO. Par Western Blot, les résultats montrent une augmentation d'expression de la forme clivée de Parp1 (20%) et de la forme clivée de la caspase 3 (x 3,24). Nous notons également une augmentation d'expression de Bax de 24%, une protéine pro-apoptotique (Figure 70A).

Ces résultats sont confirmés par la mesure de l'activité des caspases 3/7. Dans un premier temps, nous montrons une augmentation de l'activité des caspases entre les conditions non traitées et traitées. Puis, nous montrons une activité des caspases supérieures dans les conditions H1975 G4 et A549 G4 traitées au cisplatine par rapport à H1975 CA et A549 CA (augmentation de 35% de l'activité des caspases 3/7 pour H1975 G4 ; $p < 0,001$; augmentation de 50% de l'activité des caspases 3/7 pour A549 G4, $p < 0,05$) (Figure 70B et C).

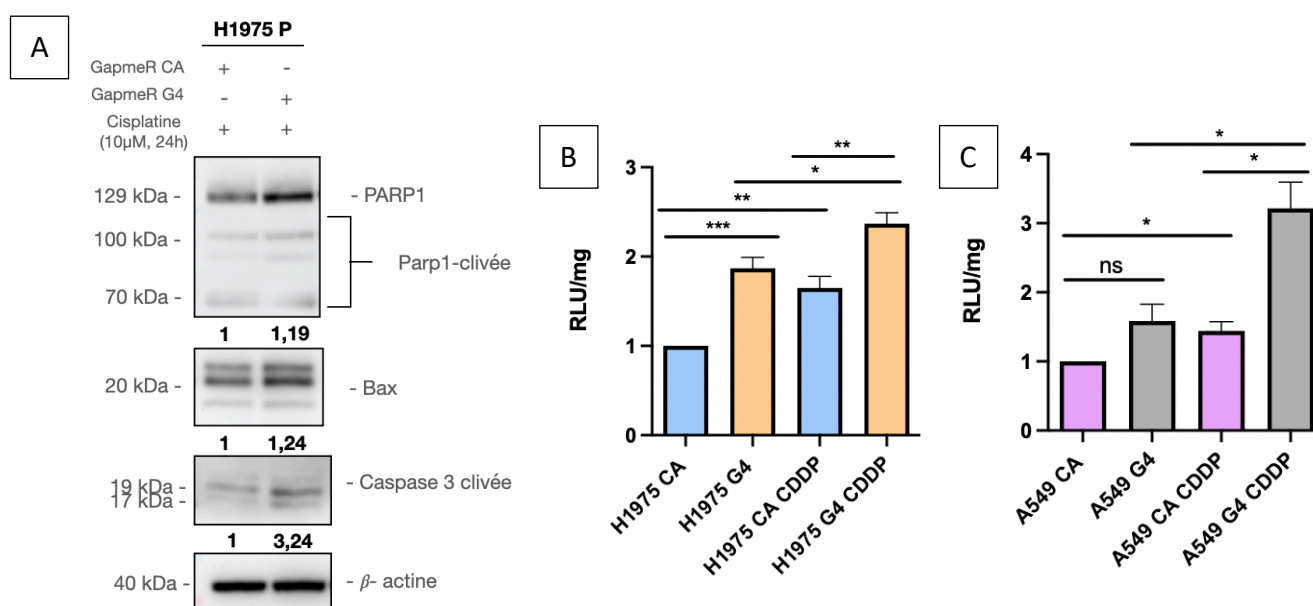


Figure 70 : Le ciblage de MUC1 favorise la mise en place du processus apoptotique après un traitement au cisplatine.

L'expression de Bax, de Parp1-clivée et de la caspase 3 clivée a été déterminée par Western Blot sur des extraits protéiques totaux, après traitement au cisplatine 10 μ M pendant 24h. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge mais aussi pour les quantifications *via* le logiciel ImageJ (A). Mesure de l'activité des caspases 3/7 *via* le Kit Caspase 3/7 Glo (Promega®) dans les lignées H1975 (B) et A549 (C) transfectées par le GapmeR contrôle CA ou ciblant MUC1 G4 et après un traitement au cisplatine 10 μ M pendant 24h. La luminescence mesurée a été rapportée à la quantité de protéine par condition (RLU/mg de protéines) (n=4). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Après avoir montré le rôle de MUC1 protégeait du processus apoptotique, nous montrons que son ciblage par une stratégie ASO de type GapmeR, inverse le phénomène et favorise l'induction de l'apoptose après un traitement au cisplatine.

d) Impact sur les autres mécanismes associés à la chimiorésistance.

i) Les transporteurs à influx et efflux du cisplatine

Dans la partie 2, nous montrons que l'expression de MUC1 module à la baisse l'expression de certains transporteurs à influx spécifiques au cisplatine, diminuant ainsi son entrée dans la cellule. L'invalidation de MUC1 permettait de réguler à la hausse l'expression de certains de ces transporteurs, luttant ainsi contre la résistance. Ici, notre objectif est de voir l'impact du ciblage de MUC1 *via* la stratégie ASO de type GapmeR, sur l'expression relative de certains de ces transporteurs. Par RT-qPCR, nous montrons une augmentation d'expression relative de CTR1 (3,5 fois ; $p < 0,05$), d'OCT1 (2,4 fois ; $p < 0,05$) et d'OCT3 (2,6 fois ; $p < 0,05$) (Figure 71A) lorsque MUC1 est ciblée par le GapmeR G4, dans la lignée H1975. Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR favorise l'expression de pompes à influx spécifiques au cisplatine, pouvant augmenter ainsi son entrée dans la cellule et sa potentielle accumulation intracellulaire.

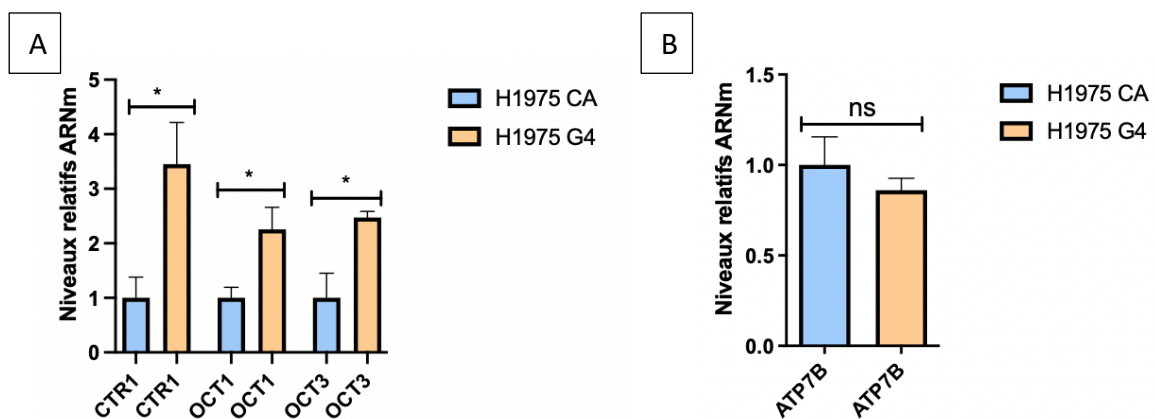


Figure 71 : Le ciblage de MUC1 augmente l'expression relative de pompes à influx et diminue l'expression des pompes à efflux spécifiques au cisplatine.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules H1975 transfectées par le GapmeR contrôle CA ou GapmeR ciblant MUC1 (G4). (A) Expression relative des transporteurs à influx spécifiques au cisplatine, (B) Expression relative des différents transporteurs à efflux spécifiques au cisplatine. * $p < 0,05$.

Dans la partie précédente, nos résultats mettent en évidence le rôle de MUC1 dans la modulation de l'expression relative de différents transporteurs à efflux du cisplatine, pouvant diminuer son accumulation intracellulaire. En ciblant MUC1 avec un ASO, nos résultats ne montrent pas de différences significatives d'expression d'ATP7B, bien qu'une légère tendance à la baisse d'expression soit observable (Figure 71B).

ii) Impact sur les transporteurs à efflux à large spectre.

Les transporteurs à large spectre sont connus dans la littérature, pour être impliqués dans la mise en place de la résistance à différentes drogues. Nous confirmons ces résultats au sein de nos différents modèles. En effet, l'expression de MUC1 régule à la hausse l'expression de certains de ces transporteurs, favorisant l'efflux du cisplatine. En ciblant MUC1 avec un ASO de type GapmeR, nous montrons une tendance globale à la baisse de l'expression relative de chacun de ces transporteurs. Le ciblage de MUC1 dans la lignée H1975 (en orange) diminue de 50% l'expression relative d'ABCC1 ($p < 0,05$), de 52% l'expression relative d'ABCC2, de 60% l'expression relative d'ABCC3 ($p < 0,05$), de 80% l'expression relative d'ABCC4 et de 55% l'expression relative d'ABCC6 ($p < 0,05$) (Figure 72). Aucune différence significative dans l'expression d'ABCC5 et d'ABCG2 n'est mise en évidence.

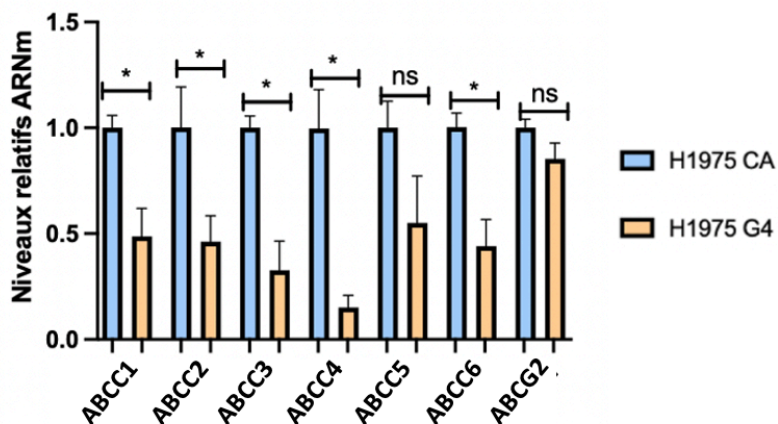


Figure 72 : Le ciblage de MUC1 régule, globalement, à la baisse l'expression des transporteurs à efflux de la famille ABC.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules H1975 transfectées par le GapmeR contrôle (CA) ou GapmeR ciblant MUC1 (G4). * $p < 0,05$

Globalement, nous montrons que **le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR G4 régule à la baisse l'expression des transporteurs à efflux de la famille ABC, ce qui permettrait l'accumulation intracellulaire du cisplatine.**

iii) *Impact sur l'acquisition du caractère « cellule souche cancéreuse ».*

MUC1 est une actrice de l'acquisition du phénotype CSC. En effet, nous montrons que son expression est corrélée positivement avec celle de facteurs de transcription impliqués dans l'auto-renouvellement et dans la différenciation cellulaire, comme SOX2 et Nanog. L'inactivation de MUC1 permet de diminuer l'expression de ces 2 facteurs de transcription et de diminuer l'acquisition de ce phénotype. Par RT-qPCR, nous montrons une tendance à la baisse de l'expression de SOX2 et une diminution d'expression relative de Nanog, d'environ 50% ($p < 0,05$) (Figure 73). Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans l'expression d'ABCG2, un transporteur ABC retrouvé au niveau des cellules souches cancéreuses (Figure 72).

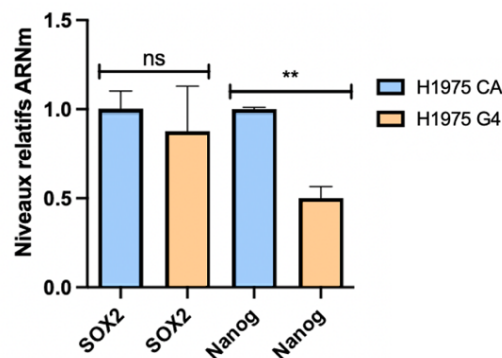


Figure 73 : Le ciblage de MUC1 diminue l'expression relative de marqueurs associés au phénotype cellule souche cancéreuse.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules H1975 transfectées par le GapmeR contrôle (CA) ou GapmeR ciblant MUC1 (G4). ** $p < 0,01$

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que **le ciblage de MUC1 par un ASO de type de GapmeR diminue l'expression des facteurs de transcription associée au phénotype CSC et diminue l'acquisition de ce phénotype, connu pour induire la résistance face aux thérapies anticancéreuses.**

DISCUSSION

XI. Discussion des résultats :

En France, le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent chez l'homme et le 3^{ème} plus fréquent chez la femme. Néanmoins, les projections à 2030, estiment que le cancer du poumon deviendra le cancer le plus fréquent chez la femme, devant le cancer du sein (Martín-Sánchez *et al.*, 2018). En dépit des avancées non négligeables au cours des dernières décennies dans le diagnostic et dans la prise en charge des cancers, le cancer bronchique, majoritairement représenté par le sous type non à petites cellules (CBNPC), demeure la première cause de mortalité par cancer, tuant chaque année 33 100 malades en France (Institut National du Cancer, 2021) et 1,8 millions de malades dans le monde (Bray *et al.*, 2024). Malgré les progrès dans le diagnostic des cancers bronchiques, ceux-ci sont généralement diagnostiqués à des stades localement avancés, rendant la résection chirurgicale impossible, ou sont inopérables. Au cours des dernières décennies, la découverte et l'essor de nouvelles thérapies puissantes offrent un large panel de thérapies personnalisées et adaptées à chaque patient. Cependant, les chimiothérapies cytotoxiques à bases de sels de platine, tel que le cisplatine (Goldstraw *et al.*, 2011 ; Boollel *et al.*, 2015) restent largement utilisées et sont définies comme un des traitements de référence des CBNPCs (Alduais *et al.*, 2023). Néanmoins, près de la moitié des patients traités présentent des résistances primaires ou secondaires au cisplatine (Boollel *et al.*, 2015). Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la chimiorésistance. De nombreux travaux ont mis en évidence que MUC1, une large O-glycoprotéine transmembranaire, est surexprimée dans 2/3 des cancers, dont 60-80% des adénocarcinomes pulmonaires, le sous type majoritaire des CBNPCs. Diverses études montrent que MUC1 joue un rôle dans l'activation de voies de signalisation intracellulaire (Nath et Mukherjee, 2014), dans la protection contre la réponse apoptotique (Raina *et al.*, 2004), dans la progression tumorale (Rajabi et Kufe., 2018), dans la promotion de la TEM (Gnemmi *et al.*, 2014) mais aussi dans la promotion de l'immunosuppression, notamment en induisant l'expression de PD-L1 (Bouillez *et al.*, 2017 a). En outre, MUC1 est impliquée dans la chimiorésistance à différentes drogues telles que l'étoposide et la gemcitabine dans le cancer du pancréas (Nath *et al.*, 2013), au cisplatine dans le cancer urogénital (Shigeta *et al.*, 2020) et dans le cancer du sein triple négatif (Yamamoto *et al.*, 2019), au paclitaxel et à l'osimertinib dans le cancer du poumon (Jin *et al.*, 2017 ; Haratake *et al.*, 2024). Mieux comprendre comment MUC1 induit la progression tumorale et la chimiorésistance permettrait de proposer une meilleure prise en charge des patients atteints de CBNPC et de définir MUC1 comme une cible thérapeutique potentielle.

C'est dans ce contexte que se sont inscrits mes travaux de thèse, au cours desquels j'ai pu étudier le rôle de MUC1 sur (i) les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires ainsi que sur (ii) les

phénomènes de chimiorésistance au cisplatine, afin de proposer (iii) une stratégie thérapeutique innovante pour cibler MUC1, *via* un ASO de type GapmeR. Pour ce projet, cinq lignées de CBNPCs présentant des « drivers oncogéniques » différents ont été utilisées, afin de voir si le rôle de MUC1 sur les propriétés cellulaires et la chimiorésistance au cisplatine, est indépendant de chacune de ces mutations.

1) Étude du rôle de MUC1 sur les propriétés des cellules cancéreuses pulmonaires.

Dans cette première partie, après avoir généré des clones PC9 exprimant stablement MUC1 et des clones H1975, A549, HCC827 et H292 invalidés pour l'expression de MUC1 par une stratégie CRISPR/Cas9, l'objectif était de conforter les différents résultats issus de la littérature démontrant un rôle de MUC1 dans la progression tumorale et dans l'agressivité, sur nos modèles cellulaires exprimant ou non MUC1. Nous montrons que l'expression de MUC1 induit (i) une prolifération cellulaire plus rapide associée à une augmentation de la phosphorylation de Erk 1/2, (ii) une capacité à former des clones à partir d'une cellule unique accrue et (iii) une meilleure viabilité cellulaire. L'invalidation de MUC1 diminue la prolifération ainsi que la phosphorylation de Erk1/2, le caractère clonogénique et la viabilité cellulaire. Ces résultats sont observables dans toutes les lignées, et ceci quel que soit le « driver oncogénique ». De plus, ces résultats sont en accord avec ceux observés dans le CBNPC par Xu *et al.*, où le ciblage de MUC1 par un siRNA permet de diminuer la prolifération cellulaire, en diminuant la phosphorylation de Erk et d'AKT, mais permet aussi de diminuer la viabilité cellulaire, en augmentant l'apoptose (Xu *et al.*, 2017). Ces résultats s'expliquent par le fait que MUC1-C, en condition cancéreuse, peut interagir physiquement avec le récepteur à l'EGF *via* la Gal3, favorisant la phosphorylation et l'activation des voies de signalisation sous-jacentes, telle que la voie PI3K/AKT, impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire (Kufe., 2013). De plus, les résultats sont en accord avec ceux observés dans le cancer du sein, par Bitler *et al.*, où il a été mis en évidence que MUC1-C interagit directement avec le récepteur à l'EGF, provoquant sa translocation nucléaire et son interaction avec la chromatine. L'EGFR en interagissant avec la chromatine, induit l'activation du promoteur du gène codant pour la cycline D1, favorisant ainsi la prolifération cellulaire (Bitler *et al.*, 2010). Pour aller plus loin dans l'étude de la prolifération cellulaire, de la cytométrie en flux peut être envisagée afin de déterminer dans quelles phases du cycle cellulaire se trouvent les cellules. De même pour la viabilité cellulaire, des marquages à l'iodure de propidium et à l'annexine V pourront être réalisés.

La migration et l'invasion sont deux propriétés essentielles d'un point de vue physiologique détournées par les cellules cancéreuses, leur permettant d'acquérir leur potentiel invasif (Mittal., 2018). En effet, la perception de signaux inflammatoires ou d'un stress par les cellules cancéreuses,

engendrent le processus de TEM, un processus clé dans la perte d'adhésion cellulaire préalable et nécessaire à la migration et l'invasion (Kufe., 2009), mais aussi dans la reprogrammation cellulaire, en induisant l'activation de facteurs de transcription pro-invasifs comme TWIST1 (Kufe., 2020). Différentes études montrent que MUC1 favorise la migration et l'invasion cellulaire ainsi que la formation de métastases (Wang *et al.*, 2015). Afin d'étudier la migration, un suivi de la fermeture de blessures standardisées après un traitement à la mitomycine C ainsi que des tests en chambre de Boyden ont été réalisés. Les résultats obtenus montrent des temps de fermeture de la blessure plus ou moins rapide suivant le type cellulaire et que les blessures des tapis cellulaires exprimant MUC1 se referment plus rapidement. Ces résultats ont été confirmés par les tests en chambre de Boyden où les cellules exprimant MUC1 migrent plus que les cellules ne l'exprimant pas. Selon notre protocole, le milieu n'étant pas changé au cours de l'expérience, ceci peut être une explication à l'absence totale de fermeture des blessures chez certaines lignées (Bouillez *et al.*, 2014). Les cellules exprimant MUC1 migrent plus que les cellules KO MUC1. Les capacités invasives des différents modèles cellulaires exprimant ou non MUC1 ont été étudiées par l'intermédiaire de chambres de Boyden recouvertes d'ECmatrix®. L'expression de MUC1 favorise la dégradation de la matrice et l'invasion. L'invalidation de MUC1 diminue le nombre de cellules ayant dégradé la matrice et envahi la membrane, confirmant ainsi les résultats obtenus par Zhao *et al.*, 2021, où le ciblage de MUC1 par le GO-203 diminue le caractère invasif (Zhao *et al.*, 2021).

Pour conclure, la première partie de mes travaux de thèse confirme le rôle de MUC1 dans la progression tumorale mais aussi dans l'agressivité dans le CBNPC et ceci quel que soit le « driver oncogénique » considéré. De plus, MUC1 représente une cible thérapeutique potentiellement intéressante, puisque son invalidation par une stratégie CRISPR/Cas9 diminue considérablement l'ensemble des propriétés étudiées. Néanmoins, il serait intéressant de confirmer ces résultats *in vivo*.

2) Étude du rôle de MUC1 sur les phénomènes de chimiorésistance au cisplatine.

L'analyse de tissus tumoraux a permis de définir MUC1 comme une des signatures moléculaires de la résistance (Zhang *et al.*, 2013 ; Sinn *et al.*, 2013). MUC1 est impliquée dans la résistance à différentes drogues dans le cancer bronchique, que ce soit des thérapies ciblées (Osimertinib : Haratake *et al.*, 2023 ; Erlotinib : Jin *et al.*, 2017) ou bien des chimiothérapies conventionnelles (Paclitaxel : Ham *et al.*, 2016 ; Xu *et al.*, 2020). Le rôle de MUC1 dans la résistance au cisplatine a été étudié dans différents cancers dont le carcinome urothélial (Shigeta *et al.*, 2020) et le carcinome squameux de l'œsophage (Zhao *et al.*, 2021). En revanche, peu de travaux se sont intéressés au rôle de MUC1 dans la résistance au cisplatine, dans le cancer du poumon. L'objectif de ma deuxième partie de thèse a été d'étudier le rôle de MUC1 sur les phénomènes de résistance au cisplatine, dans des cellules de CBNPC.

Dans un premier temps, nous montrons qu'un traitement au cisplatine accroît l'expression de MUC1 dans la lignée H1975, au cours du temps. En effet, le cisplatine pourrait générer un stress conformationnel au niveau de MUC1. Ce stress conformationnel induirait l'homodimérisation et le double clivage de MUC1-C, en partie extracellulaire et au niveau de son motif CQC en position juxtamembranaire. Ainsi clivée, MUC1 serait transloquée au noyau *via* l'importine β où elle pourrait interagir avec différents facteurs de transcription dont NF- κ B, qui a pour cible le promoteur de MUC1 et induirait sa transcription (Kufe., 2022). De plus, l'expression accrue de MUC1 associée au cancer va renforcer l'inflammation, favorisant ainsi la libération de cytokines inflammatoires, comme le TNF α et l'IL-6 dans le micro-environnement tumoral par des cellules du système immunitaire. En interagissant avec leur récepteur, ces cytokines vont générer une boucle de régulation positive de l'expression de MUC1 (Lagow et Carson., 2002 ; Kufe., 2009). Dans un second temps, l'IC50 respective à chacun de nos modèles cellulaires a été déterminée. Les valeurs d'IC50 obtenues sont supérieures (environ 2 fois) dans les lignées cellulaires exprimant MUC1. L'invalidation de MUC1 diminue les valeurs d'IC50. Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de Shigeta *et al.*, sur deux lignées cancéreuses de l'appareil urogénital : en traitant ces lignées avec des doses croissantes de cisplatine, ils ont observé une multiplication par 3,8 de l'IC50 des lignées exprimant MUC1 (Shigeta *et al.*, 2020). Nous mettons en évidence que l'expression de MUC1 diminue la sensibilité des cellules au cisplatine et que son invalidation les sensibilise. Les travaux de Levina *et al.*, dans le CBNPC, confortent nos résultats, puisqu'eux-mêmes ont réussi à rendre résistantes des cellules au cisplatine après un seul traitement et indique que la résistance au cisplatine peut être induite chez le patient dès le premier cycle de traitement (Levina *et al.*, 2008). De manière complémentaire, un test de clonogénicité couplé à un traitement avec différentes concentrations de cisplatine, montre une capacité à former des clones à partir d'une cellule unique plus importante dans la lignée H1975+. Ce résultat confirme que les cellules exprimant MUC1 sont résistantes au traitement, tout comme Zhao *et al.*, avait pu le montrer dans un modèle de carcinome squameux de l'œsophage (Zhao *et al.*, 2021). L'expression de MUC1 favorise donc la résistance au cisplatine et son invalidation sensibilise les cellules au cisplatine. Par la suite, l'objectif a été de comprendre quels étaient les mécanismes impliqués dans la résistance au cisplatine. Le mode d'action du cisplatine étant bien décrit dans la littérature (Figure 9), chaque étape a été étudiée afin de déterminer les mécanismes associés à la résistance. On parle alors de résistance « On-target ».

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'étude des dommages à l'ADN. Tous les résultats obtenus convergent vers la même conclusion : l'expression de MUC1 au sein des lignées PC9, H1975 et A549 diminue l'expression des marqueurs des cassures doubles brins, tel que γ H2AX, et diminue la quantité de dommages à l'ADN induits par le cisplatine. En revanche, l'invalidation de MUC1 par une technique CRISPR/Cas9, augmente l'expression des marqueurs des cassures doubles brins et

la quantité de dommages à l'ADN induits. L'expression de MUC1 protège, donc, des dommages et son invalidation favorise l'accumulation de dommages. Nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus dans un modèle de cancer du sein triple négatif par Shigeta *et al.*, où ils montrent une augmentation de la phosphorylation du variant d'histone H2AX, lorsque l'homodimérisation et le clivage de MUC1-C sont inhibés par le GO-203 (Shigeta *et al.*, 2020).

L'objectif d'un traitement au cisplatine est d'induire des dommages à l'ADN qui *in fine*, vont aboutir à un arrêt du cycle cellulaire (Dasari et Tchounwou., 2016). De ce fait, le cycle cellulaire et la prolifération ont été étudiés après un traitement au cisplatine. Nous montrons que l'expression de MUC1 protège d'un arrêt du cycle cellulaire, en diminuant l'accumulation de la protéine p21, et favorise la prolifération cellulaire, en augmentant la proportion de cellules marquées positivement au Ki-67. L'invalidation de MUC1 par une technique CRISPR/Cas9 favorise l'accumulation de p21 et donc l'arrêt du cycle cellulaire, et diminue la prolifération cellulaire. Malgré un traitement au cisplatine, l'expression de MUC1 protège d'un arrêt du cycle. L'étude du cycle cellulaire devra être complétée par des études en cytométrie en flux, notamment à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium et à l'annexine V.

L'arrêt du cycle cellulaire induit par le cisplatine, peut mener à la mort cellulaire par apoptose (Dasari et Tchounwou., 2016). Après un traitement au cisplatine, nous montrons que l'expression de MUC1 diminue le clivage de Parp1 et de la caspase 3, ainsi que l'expression de Bax, une protéine pro-apoptotique. En revanche, l'invalidation de MUC1 augmente le clivage de Parp1 et de la caspase 3, ainsi que l'expression de la protéine Bax. Des tests fonctionnels confirment ces résultats, et montrent moins d'activité des caspases 3 et 7, après un traitement au cisplatine, dans les modèles cellulaires exprimant MUC1. Cependant, une augmentation de l'activité des caspases 3 et 7 dans les lignées invalidées pour MUC1 après un traitement au cisplatine, est observable. En 2021, Zhao *et al.*, avait déjà montré un rôle protecteur de MUC1 face à l'apoptose dans un modèle de carcinome squameux de l'œsophage, en diminuant l'expression de Bax et en augmentant l'expression de Bcl-2. En ciblant MUC1-C avec du GO-203, les cellules devenaient plus apoptotiques après un traitement au cisplatine (Zhao *et al.*, 2021). L'expression de MUC1 protège donc du processus apoptotique normalement induit par le cisplatine.

La résistance fait intervenir des éléments indépendants du mode d'action du cisplatine, comme les transporteurs à influx et efflux, qui vont limiter l'accumulation intracellulaire du cisplatine. Différentes équipes montrent que des transporteurs à efflux sont associés à la chimiorésistance. On parle alors d'effets en amont de la cible ou d'effets « pré-target ». C'est notamment le cas des transporteurs à large spectre de la famille ABC, des transporteurs à efflux ATP-dépendant. De plus, le

rôle de MUC1 sur la modulation de l'expression de ces transporteurs a fait l'objet de différentes publications. Dans le cancer du pancréas, MUC1 induit la résistance à l'étoposide et à la gemcitabine, en régulant à la hausse l'expression des transporteurs ABCC1, 3, 5 ainsi qu'ABCB1 (Nath *et al.*, 2013). Dans ce contexte et en absence de traitement au cisplatine, nous avons donc voulu comparer l'expression relative basale de ces transporteurs entre nos clones KO MUC1 et nos clones exprimant MUC1. Nous montrons que l'expression de MUC1 est corrélée à l'augmentation de l'expression de certaines de ces pompes, dont on peut citer ABCC1 et ABCB1 (MDR1), deux transporteurs impliqués dans la résistance multidrogues et ABCC2 impliqué dans la résistance au cisplatine. Il est important de noter, que toutes les pompes ne sont pas surexprimées dans nos modèles cellulaires exprimant MUC1, potentiellement parce que chaque pompe possède une distribution tissu-spécifique (Dauchy *et al.*, 2008). Afin de pouvoir conclure sur l'activité à proprement parlé de ces pompes, un test fonctionnel, par suivi de fluorescence en cytométrie en flux a été réalisé. Ce test repose sur l'incubation de nos modèles cellulaires exprimant ou non MUC1 avec un composé fluorescent qui entre dans la cellule par diffusion passive et est éflué spécifiquement par les transporteurs de la famille ABC. La fluorescence mesurée est donc inversement proportionnelle à l'activité des pompes. Nous montrons, une diminution de la fluorescence mesurée dans les modèles PC9 et A549 exprimant MUC1, dû à une forte activité des pompes à efflux. L'inactivation de MUC1 augmente la fluorescence mesurée, reflétant moins d'activité des pompes et donc moins d'efflux. Nous ne nous sommes pas penchés sur la mécanistique mise en place dans la régulation d'expression de ces transporteurs par MUC1. Néanmoins, des travaux antérieurs tentent d'apporter des éléments de réponse. En effet, Nath *et al.* en 2013, ont émis deux explications possibles : (i) MUC1 en interagissant avec la voie PI3K/AKT induit l'activation de celle-ci et de ces gènes cibles dont ABCC1 fait partie et (ii) qu'après son clivage, MUC1 possède la capacité de stabiliser certains facteurs de transcription au niveau nucléaire, sur le promoteur du gène ABCC1 par exemple (Nath *et al.*, 2013). Dans un modèle de cellules HeLa résistantes au paclitaxel, MUC1 est retrouvée au niveau du promoteur d'ABCB1, grâce à une interaction avec l'EGFR (Jin *et al.*, 2017).

La résistance au cisplatine passe également par la surexpression de transporteurs à efflux qui sont spécifiques au cisplatine (Sprowl *et al.*, 2013), comme ATP7A et B. En 2004, une étude montre que la surexpression de ces transporteurs est une explication à la résistance au cisplatine (Safaei *et al.*, 2004). Ici, nous mettons en évidence que MUC1 régule l'expression d'ATP7A à la hausse dans les lignées PC9 et A549. MUC1 régule positivement l'expression d'ATP7B dans la lignée A549. L'inactivation de MUC1 régule négativement ces différents transporteurs, favorisant l'accumulation du cisplatine intracellulaire. En favorisant l'efflux, l'expression de MUC1 pourrait diminuer l'accumulation intracellulaire du cisplatine, limitant ainsi sa disponibilité et conduisant à la résistance. Un autre frein

à l'accumulation intracellulaire du cisplatine est la régulation à la baisse des transporteurs à influx spécifiques au cisplatine, tels que CTR1, et les transporteurs OCT (Holzer et Howell., 2006 ; Kilari *et al.*, 2016). Par RT-qPCR, nous montrons que l'expression de CTR1 dans la lignée cellulaire H1975 exprimant MUC1 est diminuée, tout comme l'expression d'OCT1 dans les lignées PC9 et H1975 exprimant MUC1. L'invalidation de MUC1 par une stratégie CRISPR/Cas9 augmente l'expression de ces deux transporteurs. Ainsi, nous mettons en évidence le rôle de MUC1 dans la modulation d'expression de ces transporteurs à influx, limitant potentiellement l'accumulation intracellulaire de la drogue et induisant la chimiorésistance.

Enfin, un dernier mécanisme impliqué dans la résistance et pour lequel la communauté scientifique a eu un fort intérêt ces dernières années, est l'acquisition du phénotype CSC. Nous montrons que l'expression de MUC1 régule à la hausse l'expression relative de Nanog et de SOX2, deux facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence et dans la reprogrammation cellulaire, dans les lignées PC9, H1975 et H292. L'invalidation de MUC1 diminue l'expression de ces deux facteurs de transcription. Ces résultats suggèrent que l'expression de MUC1 favoriserait l'acquisition du phénotype CSC. D'un point de vue mécanistique, il a été clairement étudié que MUC1, en induisant la TEM, était une actrice clé de l'acquisition du phénotype CSC, notamment en stabilisant des facteurs de transcription tel que la β -caténine ou NF- κ B qui vont alors induire l'activation de certains promoteurs de gènes, mais aussi en induisant des reprogrammations épigénétiques, triméthylant ou déméthylant le promoteur de certains gènes (Ponnusamy *et al.*, 2013 ; Kufe, 2022).

En conclusion de cette deuxième partie, l'ensemble de nos résultats montrent que MUC1 est une actrice de la chimiorésistance au cisplatine (i) en protégeant des dommages à l'ADN, (ii) en empêchant un arrêt du cycle cellulaire, (iii) en diminuant l'initiation du processus apoptotique, (iv) en modulant l'expression de transporteurs à influx et efflux et (v) en induisant l'acquisition du phénotype cellule souche cancéreuse. De manière intéressante, l'invalidation de l'expression de MUC1 sensibilise les cellules au cisplatine et renverse tous les résultats obtenus. MUC1 représente donc une cible thérapeutique intéressante dans la lutte contre la résistance aux chimiothérapies cytotoxiques à base de sels de platine, comme le cisplatine.

3) Ciblage de MUC1 avec une stratégie oligonucléotide antisens de type GapmeR.

Comme vu précédemment, MUC1 représente une cible thérapeutique potentielle, car elle intervient dans la progression tumorale, mais aussi dans la chimiorésistance au cisplatine. De plus, MUC1 est définie comme la 2^{ème} meilleure cible potentielle sur 75 antigènes associés au cancer, pour le développement de thérapies anti-cancéreuses. Dans ce projet, nous avons ciblé MUC1 avec une

stratégie innovante : un ASO de type GapmeR. Cette stratégie est déjà utilisée *in vivo* dans des modèles de fibroses hépatiques (données non publiées) et pulmonaires (Savary *et al.*, 2019), au sein du laboratoire. L'avantage de cette stratégie est que les ASO empêchent l'expression de MUC1 pleine longueur, à l'inverse du traitement GO-203, l'inhibiteur de MUC1 le plus décrit, qui cible l'homodimérisation intracellulaire de MUC1-C. Cette stratégie est d'autant plus attrayante que des études montrent que MUC1-N peut aussi jouer un rôle dans la chimiorésistance (Miyazaki *et al.*, 2023) et que son ciblage pourrait être un moyen de lutter contre celle-ci.

Après avoir testé plusieurs GapmeR et choisi celui qui offre la meilleure inhibition de MUC1, nous avons étudié son impact sur la progression tumorale mais aussi sur l'agressivité. A l'aide des mêmes tests mis en place dans la partie 1, nous montrons que le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue le caractère prolifératif, la viabilité cellulaire, la capacité à former des clones à partir d'une cellule unique, ainsi que les caractères migratoires et invasifs. De manière intéressante, les résultats sont similaires à ceux obtenus dans les lignées invalidées pour l'expression de MUC1 par une stratégie CRISPR/Cas9. Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue donc la progression tumorale et l'agressivité.

Fort de ces résultats, nous avons voulu voir si le ciblage de MUC1 par le GapmeR permettait de lutter contre la résistance au cisplatine. La détermination de l'IC50 des lignées transfectées par le GapmeR G4 montre que la diminution d'expression de MUC1 sensibilise les cellules au cisplatine. De manière intéressante, les valeurs d'IC50 obtenues sont identiques à celles des lignées KO MUC1. A partir de ces résultats, les mêmes tests que dans la partie 2 ont été réalisés. Le ciblage de MUC1 par un GapmeR dans les lignées d'adénocarcinomes pulmonaires H1975 et A549 sensibilise les cellules au cisplatine (i) en favorisant les dommages à l'ADN induits par le cisplatine, (ii) en induisant un arrêt du cycle cellulaire par accumulation de p21, (iii) en diminuant la prolifération cellulaire, (iv) en favorisant l'initiation du processus apoptotique en diminuant l'expression de Bax, en augmentant le clivage et l'activité des caspases 3 et 7 et en augmentant le clivage de Parp1, (v) en diminuant l'expression de certaines pompes à efflux de la famille ABC et de certaines pompes spécifiques au cisplatine, (vi) en augmentant l'expression de pompes à influx du cisplatine comme CTR1 et OCT1 et enfin (vii) en diminuant l'expression de Nanog et de SOX2, deux facteurs de transcription impliqués dans l'acquisition du phénotype CSC.

En conclusion, la stratégie développée et mise en place au sein de cette troisième partie présente des résultats plutôt encourageants, d'autant plus qu'ils sont très proches de ceux obtenus dans les lignées KO MUC1. Néanmoins, la limite de notre modèle est qu'il s'agit d'un modèle classique

de culture cellulaire en 2D. Afin d'aller plus loin et de conforter les résultats, il serait judicieux de tester le GapmeR dans un modèle murin.

PERSPECTIVES ET CONCLUSION GÉNÉRALE

XII. Perspectives :

1) Explorations complémentaires, *in vitro*, du rôle de MUC1 dans la résistance au cisplatine.

Bien que les résultats obtenus au cours de ma thèse confirment le rôle de MUC1 dans la progression tumorale, l'agressivité et la chimiorésistance au cisplatine, des expériences complémentaires devront être menées pour conforter nos résultats. Après avoir étudié les dommages à l'ADN, le cycle cellulaire et l'apoptose, il pourrait être intéressant d'étudier le stress oxydatif induit par le cisplatine, en dosant les systèmes de compensation des ROS comme le GSH (réduit), le GSSG (oxydé) et les systèmes de détoxification cellulaire comme la métallothionéine, d'autant plus que ces différents systèmes sont connus comme impliqués dans la résistance au cisplatine (Galluzzi *et al.*, 2012). Après avoir montré par RT-qPCR que l'expression de MUC1 au sein des lignées d'adénocarcinomes pulmonaires module l'expression de transporteurs à influx et efflux du cisplatine, il pourrait être intéressant d'étudier l'expression protéique de chacun de ces transporteurs et de doser le cisplatine intracellulaire par une technique de spectrométrie d'absorption atomique, comme il a été fait dans l'étude de Dewaeles *et al.*, afin de confirmer le rôle de MUC1 dans la diminution de l'accumulation du cisplatine intracellulaire (Dewaeles *et al.*, 2022). Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes associés à la résistance au cisplatine médiée par MUC1, d'autres mécanismes restent à élucider. En effet, il est largement admis que la TEM est un des mécanismes de la résistance au cisplatine. La TEM est un processus biologique que les cellules cancéreuses détournent afin d'acquérir leur potentiel invasif (migration, invasion préalable à la formation des métastases), mais aussi l'état de CSC, un phénotype impliqué dans la résistance aux thérapies mais aussi dans la recrudescence de la maladie. Une étude de Kryczka *et al.*, en 2021, montre que la production de TGF- β par les macrophages de type 2 du microenvironnement immunitaire, enclenche la TEM, transformant les cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses mobiles et moins prolifératives, ce qui les rend résistantes au cisplatine (Kryczka *et al.*, 2021). De plus, des travaux antérieurs de notre équipe ont permis de montrer que la surexpression de MUC1 dans des lignées cancéreuses rénales, induit la TEM en stabilisant la β -caténine sur le promoteur de Snail (Gnemmi *et al.*, 2014). D'autres études vont également dans ce sens, et suggèrent que le complexe formé entre MUC1 et la β -caténine réprime l'expression de l'E-cadhérine, une protéine nécessaire à la formation des jonctions adhérentes, et induit l'expression d'autres facteurs de transcription inducteurs de la TEM (Kufe., 2009 ; Roy *et al.*, 2011). Conformément à la définition de la TEM et après avoir montré que l'expression de MUC1 favorise l'acquisition du potentiel invasif en augmentant les propriétés de migration et

d'invasion, il pourrait être intéressant de déterminer si l'expression de MUC1, dans nos modèles cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires, est associée à la TEM. Pour investiguer cela, les niveaux d'expression de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, CK8/18) et mésenchymateux (vimentine, fibronectine, snail, N-cadhérine) pourront être déterminés par western blot et immunofluorescence. Le phénotype CSC devra aussi être étudié plus précisément. Pour confirmer nos résultats préliminaires, il faudrait regarder en cytométrie en flux l'expression de marqueurs de surface associés au phénotype souche comme CD133, CD90 ou CD44. En s'appuyant sur les données publiées en 2016 par Ham *et al.*, nos différents modèles cellulaires exprimant ou non MUC1 pourront être ensemencés sur une matrice d'agar, de manière à déterminer leur potentiel à former des sphères en culture, ainsi que le potentiel d'auto-renouvellement de ces sphères (Ham *et al.*, 2016).

Dans ce projet de thèse, nous avons décidé d'utiliser le cisplatine, une chimiothérapie cytotoxique largement utilisée dans le traitement des cancers bronchiques. Néanmoins, il est admis que le cancer du poumon peut être traité de différentes manières et notamment à l'aide de thérapies ciblées. De plus, les lignées cellulaires de CBNPCs que nous avons utilisées, présentent des « drivers oncogéniques » pour lesquels il existe des thérapies ciblées. Dans la littérature, il a été montré que MUC1 pouvait induire la résistance à certaines thérapies ciblées dans d'autres modèles cellulaires. De ce fait, il pourrait être intéressant de voir si MUC1 intervient également dans la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase au sein de nos modèles cellulaires, tels que l'osimertinib, l'erlotinib, le capmatinib ou encore le sotorasib. L'impact du ciblage de MUC1 par le GapmeR sur la réponse aux ITKS pourra également être évalué.

2) Confirmation des résultats sur un modèle murin de xénogreffe hétérotopique.

Afin de conforter nos résultats obtenus *in vitro*, il est nécessaire de mettre en place un modèle *in vivo*. Pour cela, un modèle murin xénogreffé avec des cellules H1975 exprimant ou non MUC1 est envisagé.

a) Confirmation du rôle de MUC1 dans la progression tumorale, in vivo.

Dans un premier temps, ce modèle permettra de suivre le développement des masses tumorales, et de confirmer le rôle de MUC1 dans la progression tumorale. Des cellules H1975 exprimant ou non MUC1 seront injectées, à raison de 5 000 000 de cellules, par voie sous-cutanée à des lots de souris femelles immunodéficientes (NOD SCID), de 8 semaines. Le développement des masses tumorales sera

suivi entre 6 et 8 semaines après l'injection, par mesure de la taille de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse, deux à trois fois par semaine (sauf si atteinte des points limites : perte de poids supérieure à 20%, taille de la tumeur supérieure à 17mm de diamètre, ulcération/infection au niveau du site de la tumeur...). A la fin de l'expérience, les souris seront sacrifiées et les tumeurs récupérées. Les tumeurs seront coupées en deux pour être, soit congelées pour extraction d'ARN et de protéines, soit incluses en paraffine pour analyse immunohistochimiques. Par immunohistochimie, l'angiogenèse (CD31), la lymphogenèse (LYVE-1, D2-40), la présence de CAF (α -SMA), l'apoptose (TUNEL, caspase 3 et PARP clivés), la nécrose ainsi que l'expression de marqueurs relatifs à la TEM (E-cadhérine, vimentine, N-cadhérine...) seront étudiés. Ces paramètres seront également étudiés par Western Blot et par qPCR.

b) Confirmation du rôle de MUC1 dans la chimiorésistance au cisplatine, in vivo.

Dans un second temps, ce modèle permettra de confirmer les résultats obtenus concernant la résistance au cisplatine induite par MUC1. Les mêmes conditions expérimentales seront utilisées que précédemment. Dès lors que les masses tumorales seront de taille suffisante, autour de 400-500mm³ (autour de J28 selon la littérature) (He *et al.*, 2021 ; Lu *et al.*, 2020) les souris seront traitées ou non au cisplatine à raison de 3mg/kg par voie intrapéritonéale pendant 6 jours. Au cours de l'expérience, l'état des souris sera vérifié quotidiennement. La taille des tumeurs sera mesurée à l'aide d'un pied à coulisse deux à trois fois par semaine. A la fin de l'expérience, les souris seront sacrifiées, les tumeurs récupérées et les expériences précédemment citées seront réalisées.

c) MUC1 cible thérapeutique : effet sur la progression tumorale, in vivo.

Après avoir confirmé les rôles de MUC1 sur la progression tumorale et définie celle-ci comme une cible thérapeutique potentielle, la stratégie ASO de type GapmeR développée *in vitro* sera testée sur ces mêmes modèles. Après injection de 5 000 000 de cellules H1975 MUC1+ en sous cutanée et développement de la masse tumorale pendant 28 jours jusqu'à atteindre 400-500mm³, le GapmeR ciblant MUC1 et le GapmeR contrôle seront injectés en intra-tumorale à raison de 10mg/kg tous les 4 jours (2 fois par semaine). Le développement des masses tumorales sera suivi entre 6 et 8 semaines après l'injection des cellules, par mesure de la taille de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse, deux à trois fois par semaine (sauf si atteinte des points limites : perte de poids supérieure à 20%, taille de la tumeur supérieure à 17mm de diamètre, ulcération/infection au niveau du site de la tumeur...). Au bout de la cinétique, les souris seront sacrifiées, les tumeurs récupérées et soit congelées pour extraction d'ARN et de protéines, soit incluses en paraffine pour analyse immunohistochimiques afin de réaliser les mêmes expériences que décrites auparavant.

d) MUC1 cible thérapeutique : effet sur la chimiorésistance au cisplatine, in vivo.

La stratégie ASO testée *in vitro*, sera évaluée *in vivo*, afin de voir si le ciblage de MUC1 chimiosensibilise les cellules tumorales au cisplatine. A l'aide du même modèle d'injection sous cutanée sur des souris SCID NOD femelles, le GapmeR ciblant MUC1 et le GapmeR contrôle seront injectés en intra-tumorale à raison de 10mg/kg une semaine et 3 jours avant les injections de cisplatine, à partir du moment où la taille des tumeurs aura atteint un volume de 400 à 500 mm³, soit environ 28 jours après injection des cellules. En parallèle, le cisplatine sera injecté ou non à hauteur de 3mg/kg pendant 6 jours par voie intra-péritonéale. L'état des souris ainsi que leur poids sera mesurée quotidiennement. La taille des tumeurs sera également mesurée. A la fin de l'expérience, les souris seront sacrifiées et les tissus récupérés afin d'effectuer les expériences précédemment décrites.

3) MUC1 : actrice de la modulation du microenvironnement immunitaire tumoral ?

En 2017, Bouillez *et al.*, ont montré, *in vitro*, dans le CBNPC et dans un modèle murin, que l'expression de MUC1 (i) était corrélée à l'expression de PD-L1 et (ii) réprimait l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le MCP-1, le GM-CSF et l'IFN γ , impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires, (iii) affectait les fonctions effectrices des lymphocytes TCD8⁺ infiltrants la tumeur et (iv) empêchait l'élimination des cellules tumorales MUC1⁺, conférant un rôle immunosuppresseur à MUC1 (Bouillez *et al.*, 2017 a et b). MUC1 peut également moduler les fonctions des macrophages infiltrants la tumeur (TAMs) et favoriser leur conversion en macrophages de type 2, producteur d'IL-10 et associés à l'immunosuppression en inhibant les fonctions effectrices des LT CD8 et des cellules NK (Pan *et al.*, 2020). Une étude de 2023 montre que MUC1 module l'activité des cellules NK, des cellules de l'immunité innée capables d'éliminer les cellules tumorales, en réprimant l'expression de MICA/MICB, les ligands activateurs de celles-ci (Morimoto *et al.*, 2023). Grâce à ces données, il nous a paru intéressant de voir si MUC1 modulait l'expression de PD-L1 et de certaines cytokines (IL-4, IL-13 et IL-10) associées à la conversion des macrophages M0 en macrophages M2. Des résultats préliminaires obtenus par RT-qPCR, montrent que MUC1 induit l'expression de PD-L1, et augmente l'expression de ces cytokines dans les lignées H1975 et PC9 (sauf IL-10) (Figure 74 A et B). Ces résultats sont également observables sur tissus de patients, où l'expression de MUC1 est corrélée avec un score PD-L1 élevé ($p=0,035$) (Collaboration avec le Dr. Jean-Baptiste Gibier, CBP, CHU de Lille) (Figure 74D). Ces résultats suggèrent, une nouvelle fois, le rôle de MUC1 dans l'immunosuppression. De manière intéressante, nous montrons par RT-qPCR que le ciblage de MUC1 par le GapmeR dans la

lignée H1975, diminue l'expression relative de PD-L1 de 75% ($p<0,01$), d'IL-4 de 38% ($p<0,05$), d'IL-10 de 60% ($p<0,05$) et d'IL-13 de 35% ($p<0,05$) (Figure 74 C). Ces résultats suggèrent que le ciblage de MUC1 par un ASO permet de diminuer l'expression de PD-L1 ainsi que celle de cytokines impliquées dans la conversion des macrophages M0 en macrophages M2, associés à l'immunosuppression et permettrait de restaurer l'immunocompétence du microenvironnement tumoral.

Ces différentes cytokines devront être dosées par une technique ELISA afin de vérifier que celles-ci sont sécrétées. Par la suite, des systèmes de co-culture entre les cellules exprimant ou non MUC1 et des macrophages M0 sont envisagés, ainsi que l'exposition de macrophages M0 avec des milieux de culture conditionnés par des cellules exprimant ou non MUC1, suivi d'une analyse en cytométrie en flux pour déterminer la proportion de macrophages M1 (CD38, CD80) et M2 (CD206, CD00R). Des données publiées montrent que MUC1 module l'activité des cellules NK. Afin de conforter ces résultats, la co-culture des cellules NK avec des cellules de CBNPC exprimant ou non MUC1 sera envisagée et l'activité cytotoxique des NK, par un test Cell Titer Glo® (Promega) sera déterminée. Enfin, le rôle de MUC1 sur l'activité cytotoxique des LT pourra être évaluée en co-cultivant des LTCD8+ et des cellules cancéreuses pulmonaires exprimant ou non MUC1. L'activité cytotoxique des LT sera évaluée par cytométrie en flux et par un test Cell Titer Glo® (Promega). Pour aller plus loin dans l'étude du rôle de MUC1 sur le microenvironnement immunitaire tumoral, le recours à un modèle murin pré-clinique immunocompétent du type SFTPC-CRE ; k-RAS-G12D développant des adénocarcinomes pulmonaires après induction au tamoxifène, est envisagé. La stratégie ASO de type GapmeR sera également développée dans cette étude, afin de voir si le ciblage de MUC1 permet de restaurer un microenvironnement immunitaire tumoral compétent.

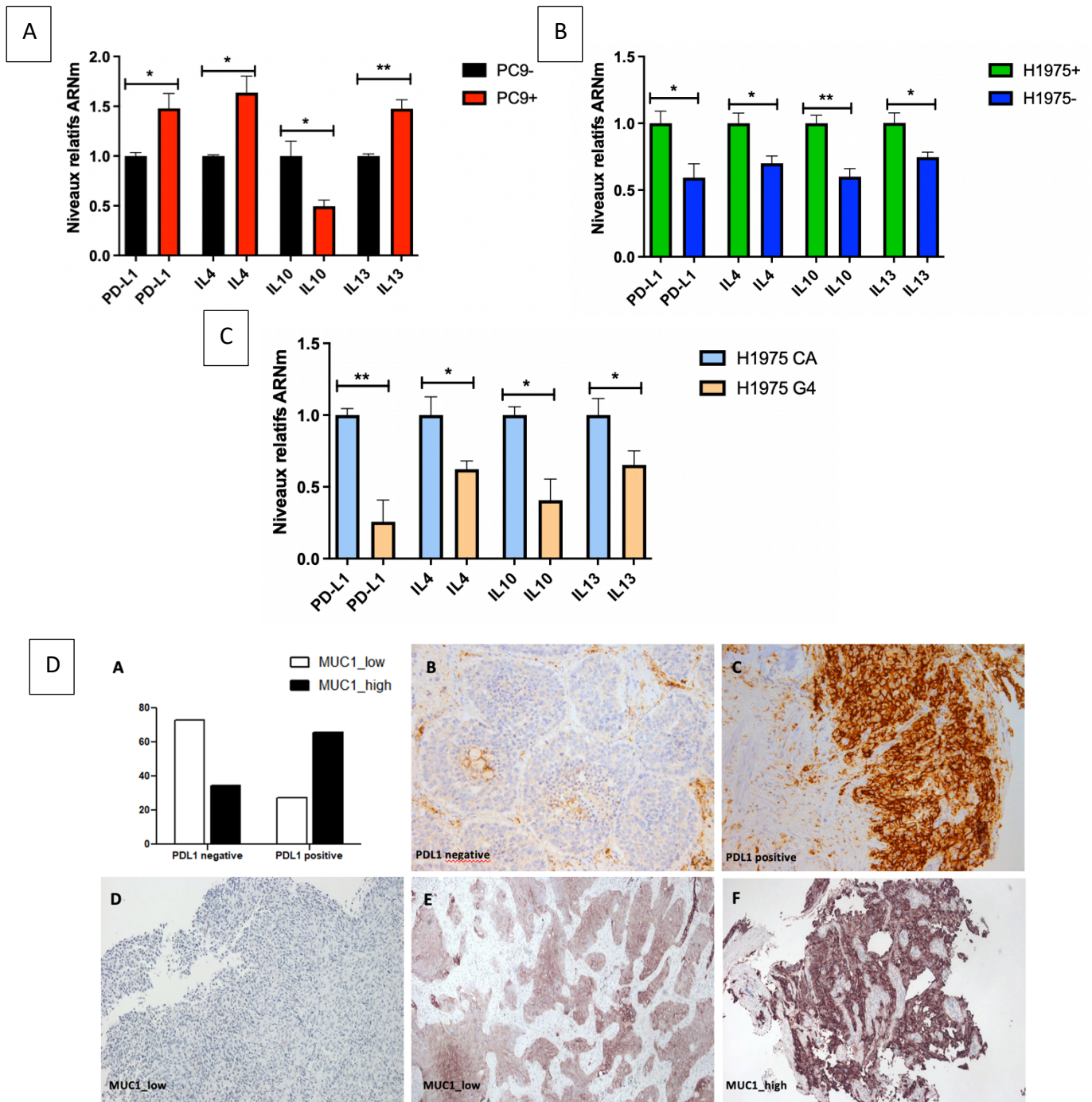


Figure 74 : MUC1 régule positivement l'expression de PD-L1, *in vitro* et *in vivo*, et de cytokines associées à l'immunosuppression, *in vitro*.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules PC9 exprimant ou non MUC1 (n=3) (A), H1975 exprimant ou non MUC1 (n=3) (B) et H1975 transfectées avec le GapmeR contrôle CA ou ciblant MUC1 G4 (n=3) (C).

D) A) Représentation graphique de la distribution (en pourcentage) des cas de MUC1 faible et élevé dans les sous-groupes PD-L1 (négatif ou positif). L'expression élevée de MUC1 était significativement associée à un score PDL1 élevé (p : 0,035)

*Le score PDL1 était considéré comme négatif lorsque moins de 50% des cellules étaient positives quelle que soit l'intensité de la coloration (B). Il était considéré comme positif dans le cas contraire (C)

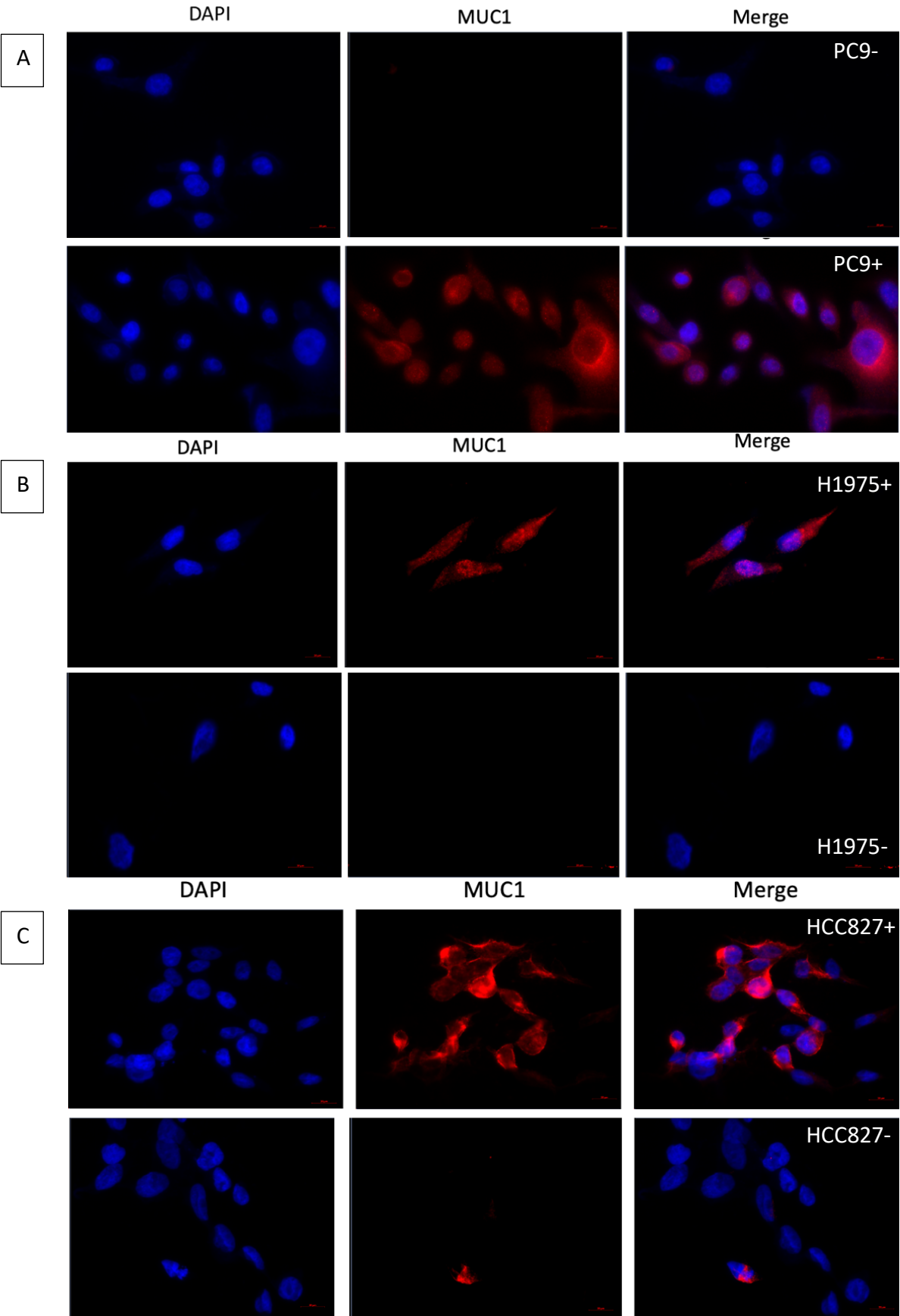
MUC1 a été considéré comme faible lorsque la coloration était absente ou lorsque l'intensité de la coloration était faible dans la plupart des cellules tumorales (D, E). Dans le cas contraire, il a été considéré comme positif (F) p<0,05 ; ** p<0,01.

XIII. Conclusion Générale :

En conclusion, MUC1 est une actrice de la progression tumorale, de la chimiorésistance au cisplatine et semble favoriser la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur dans le CBNPC. L'objectif de notre équipe est de démontrer que MUC1 est une cible thérapeutique potentielle. Son ciblage par une stratégie innovante de type GapmeR, dans les cellules cancéreuses pulmonaires, (i) diminue la progression tumorale ainsi que (ii) la chimiorésistance au cisplatine induite par MUC1 et (iii) semble instaurer un microenvironnement tumoral immunocompétent. Après consolidation de nos résultats, cette stratégie prometteuse pourrait être applicable dans d'autres cancers puisque MUC1 est sur-exprimée dans 2/3 des cancers et représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans la lutte contre l'agressivité cancéreuse et contre la résistance aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées.

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

Figures supplémentaires :



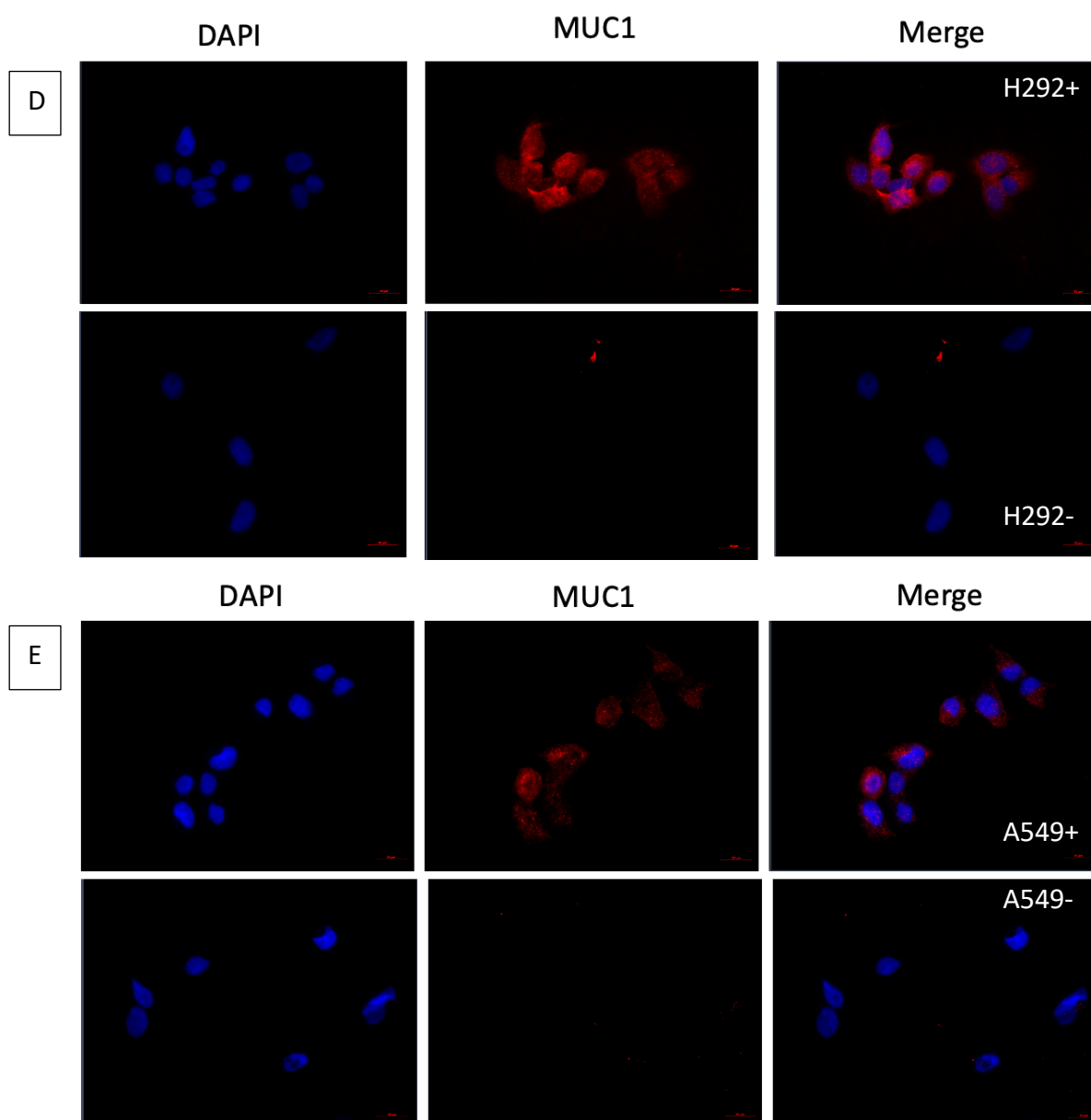


Figure S1 : Validation des modèles cellulaires, par immunofluorescence de MUC1 (x40).

Suivi de l'expression de MUC1 par immunofluorescence au sein des lignées A) PC9, B) H1975, C) HCC827, D) H292 et E) A549. Les images ont été prises *via* l'Apoptome et les images analysées par le logiciel associé au microscope.

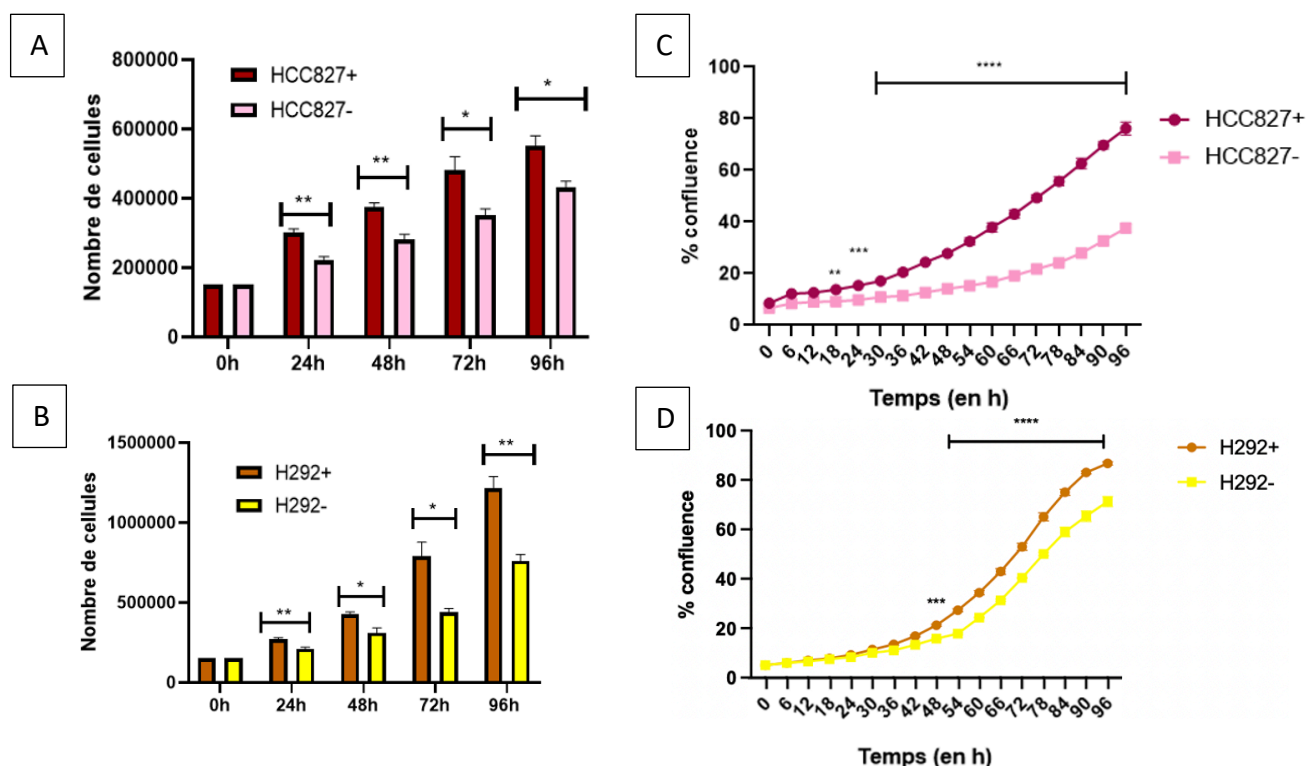


Figure S2 : L'expression de MUC1 favorise la prolifération cellulaire, au sein des différentes lignées d'adénocarcinomes pulmonaires HCC827 et H292.

Après ensemencement à hauteur de 150 000 cellules par puits, les cellules HCC827 (A) et les cellules H292 (B) exprimant ou non MUC1 ont été comptées sur cellule de Malassez toutes les 24h, pendant 4 jours (n=3). Après ensemencement à hauteur de 25 000 cellules par puits, la confluence des tapis cellulaires des HCC827 exprimant ou non MUC1 a été suivie par la technologie Incucyte® avec prise de photos toutes les 6 heures pendant 4 jours, (n=3). Les images ont ensuite été analysées *via* le logiciel associé à l'appareil. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001

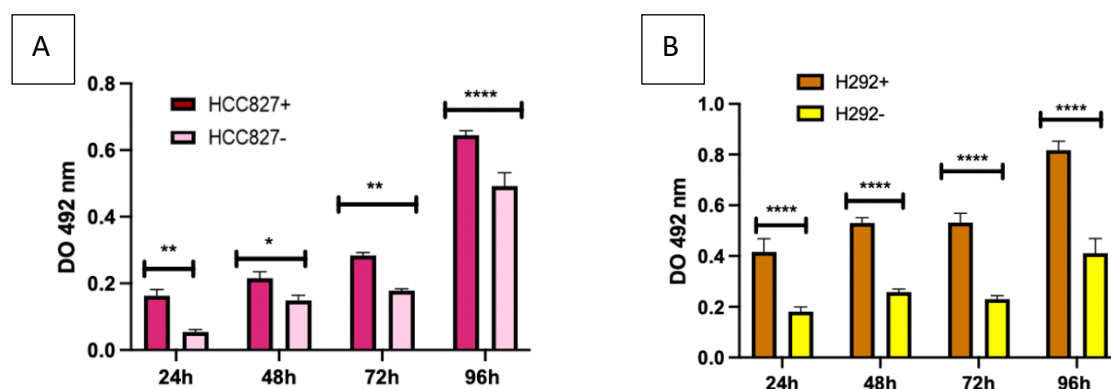


Figure S3 : L'expression de MUC1 favorise la viabilité cellulaire des cellules HCC827 et H292.

Test de viabilité (MTS) réalisé à 24, 48, 72 et 96h après ensemencement sur les cellules (A) HCC827 exprimant ou non MUC1 et (B) H292 exprimant ou non MUC1 (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001.

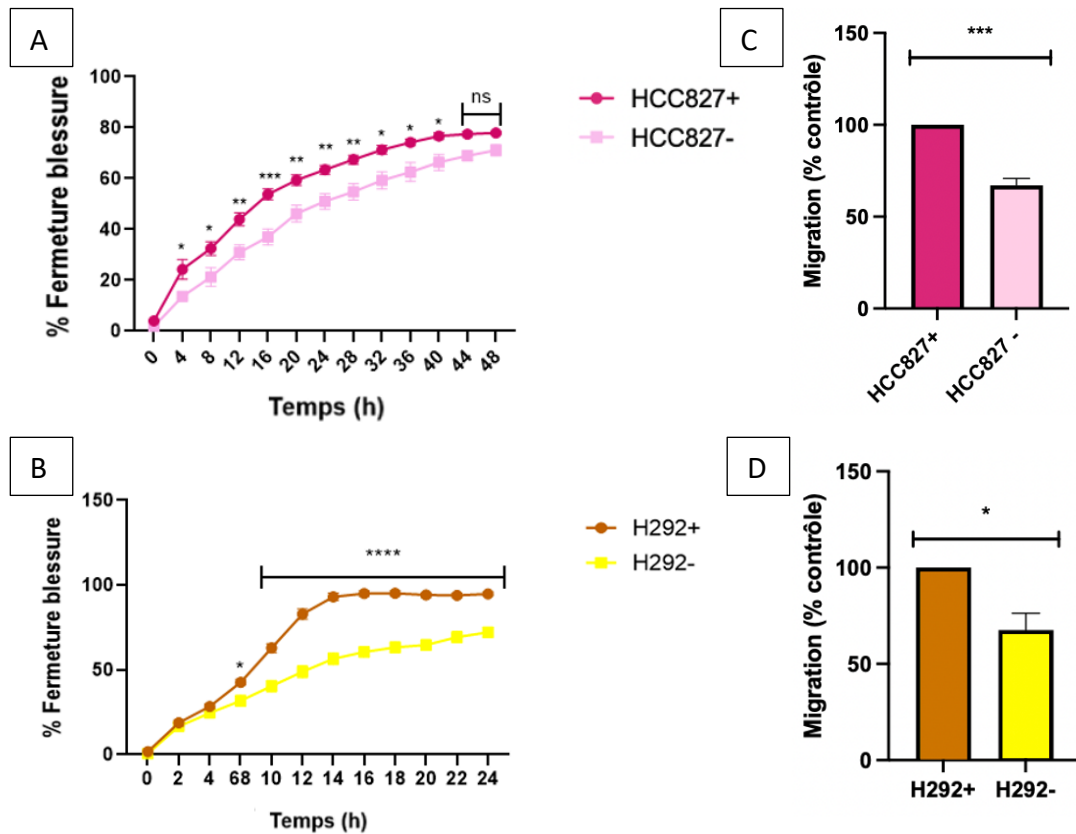


Figure S4 : L'expression de MUC1 favorise la migration des cellules HCC827 et H292.

Mesure de la confluence relative de la blessure standardisée réalisée à l'aide du WoundMarker (Essen Bioscience) sur les cellules HCC827 (A) et H292 (B) exprimant ou non MUC1 (n=3). Détermination des capacités migratoires des modèles cellulaires exprimant ou non MUC1, par l'intermédiaire de Chambre de Boyden. 24h après ensemencement, les cellules ayant migré ont été lysées, colorées et la fluorescence émise mesurée. La fluorescence obtenue est proportionnelle au nombre de cellules ayant migrés. Les résultats ont été normalisés par rapport à la lignée parentale contrôle (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001.

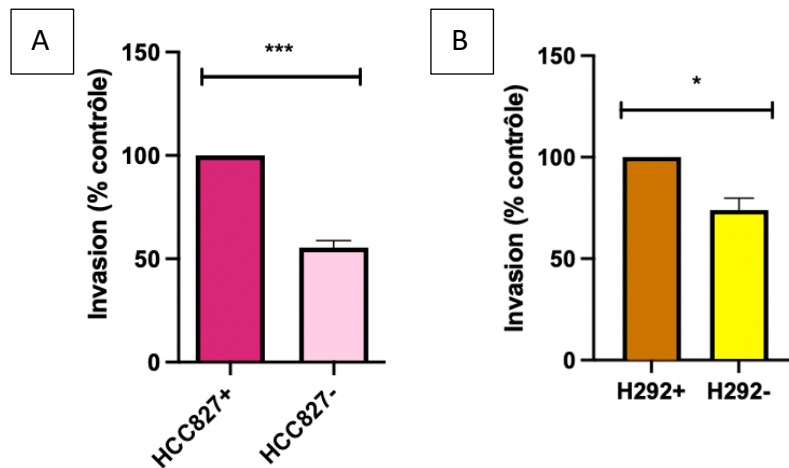


Figure S5 : L'expression de MUC1 au sein des différents modèles cellulaires favorise les capacités invasives.

Mesure des capacités invasives des cellules HCC827 (A) et H292 (B) exprimant ou non MUC1, par l'intermédiaire de chambre de Boyden recouverte d'ECmatrice. 24h après l'ensemencement, les cellules sont colorées, lysées et la fluorescence émise est mesurée. La fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules ayant dégradés l'ECmatrice et ayant migrés vers le compartiment enrichi en SVF. Les résultats ont été normalisés par rapport au clone parentale contrôle (n=3). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

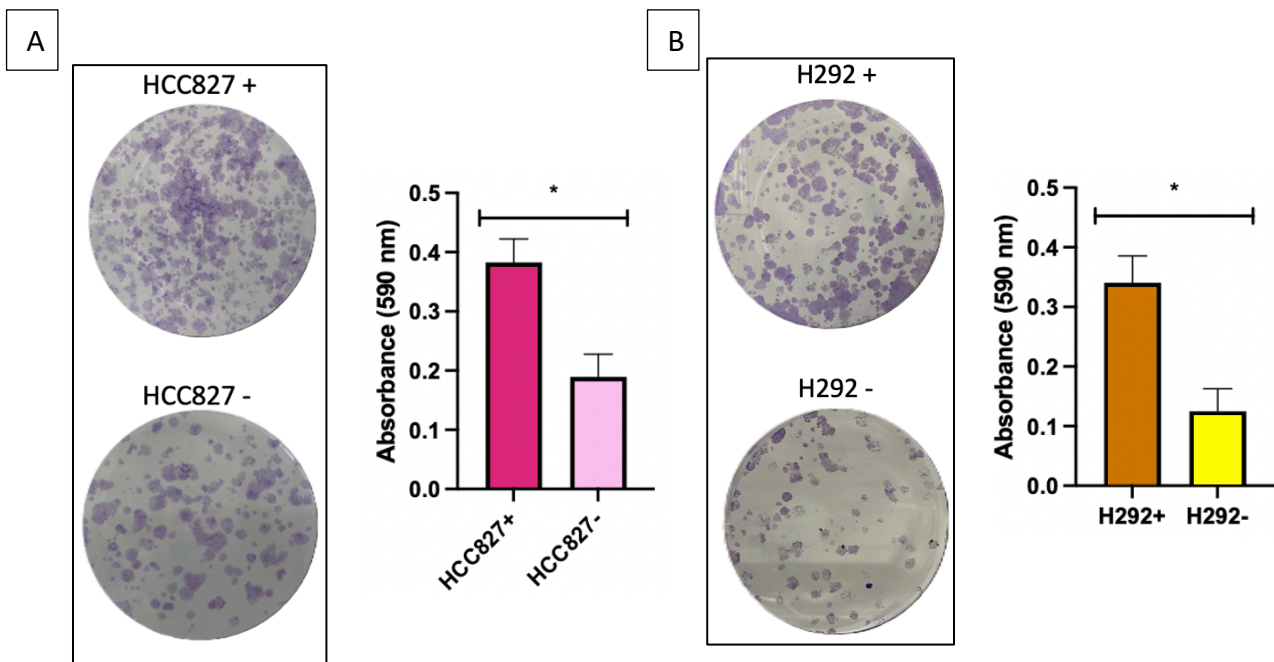


Figure S6 : L'expression de MUC1 favorise la clonogénicité des cellules HCC827 et H292.

Test de clonogénicité réalisé sur les cellules HCC827 (A) et H292 (B), exprimant ou non MUC1. Les colonies ont été colorées avec du crystal violet 14 jours après l'ensemencement. Une quantification du crystal violet fixé a été réalisée, après extraction. L'absorbance mesurée à 590 nm est proportionnelle aux nombres de colonies formées (n=3). ** $p < 0,01$.

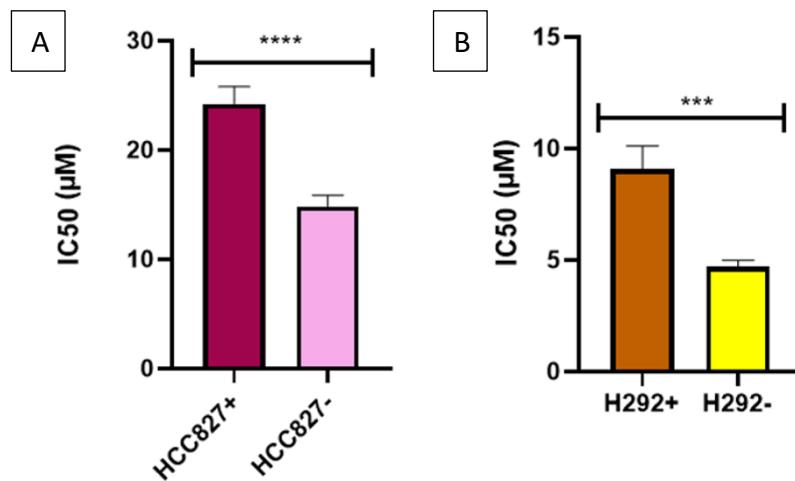


Figure S7 : Les cellules HCC827 et H292 exprimant MUC1 sont plus chimiorésistantes au cisplatine.

24h après ensemencement, les cellules HCC827 (A) et H292 (B) exprimant ou non MUC1 ont été traitées avec des doses croissantes de cisplatine (0 à 200 μM). 72h après traitement au cisplatine, un test MTS a été réalisé afin de déterminer les IC50 respectives à chacune des lignées (Tableau 4). *** p<0,001 ; **** p<0,0001

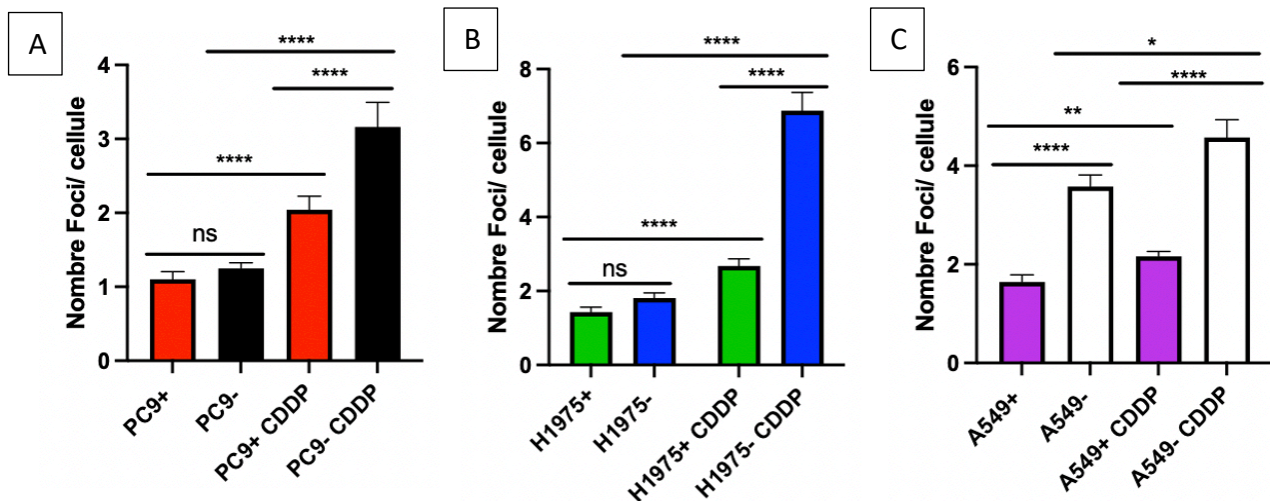


Figure S8 : L'expression de MUC1 diminue le nombre de foci p-ATM par cellule et protège des dommages à l'ADN.

Dénombrement des foci p-ATM par immunofluorescence sur lame après traitement ou non au cisplatine (CDDP) 10 μM pendant 24h, dans les lignées PC9 (B), H1975 (C) et 14 μM pendant 24h dans la lignée A549 (D) (n=3).

* p<0,05 ; **** p<0,0001

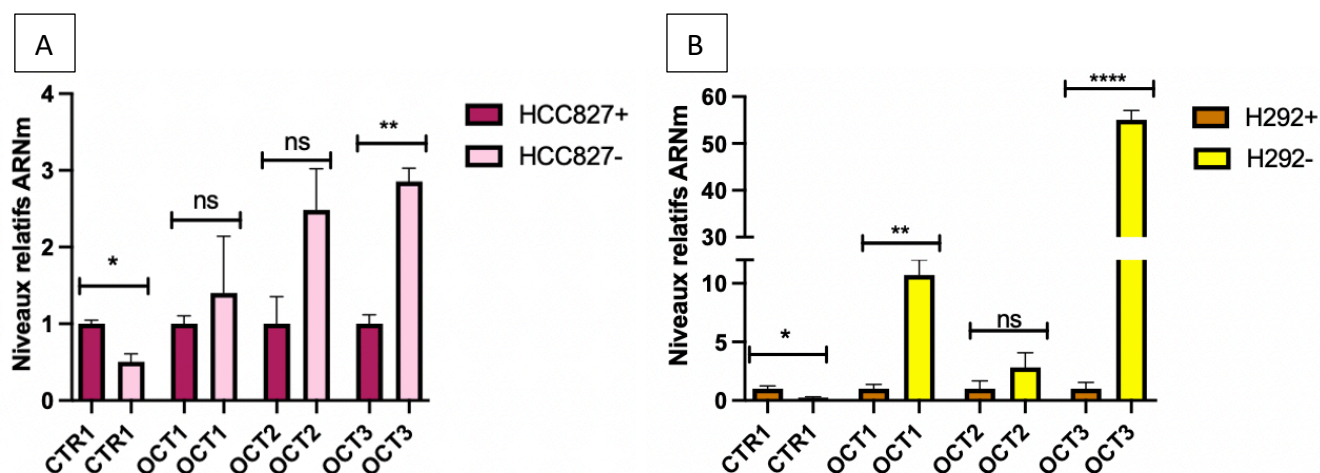


Figure S9 : MUC1 module l'expression de certains transporteurs à influx spécifique du cisplatine, dans les cellules HCC827 et H292.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules HCC827 (A) et H292 (B) exprimant ou non MUC1 (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ****p<0,0001.

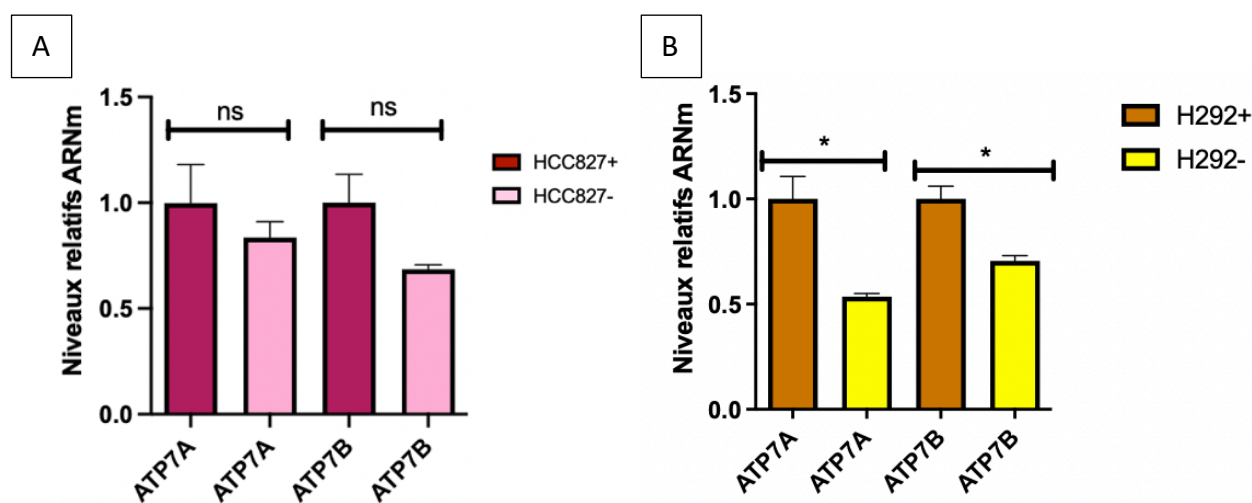


Figure S10 : MUC1 module l'expression relative des transports à efflux spécifique au cisplatine, dans les cellules HCC827 et H292.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules HCC827 (A) et H292 (B) exprimant ou non MUC1 (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ****p<0,0001.

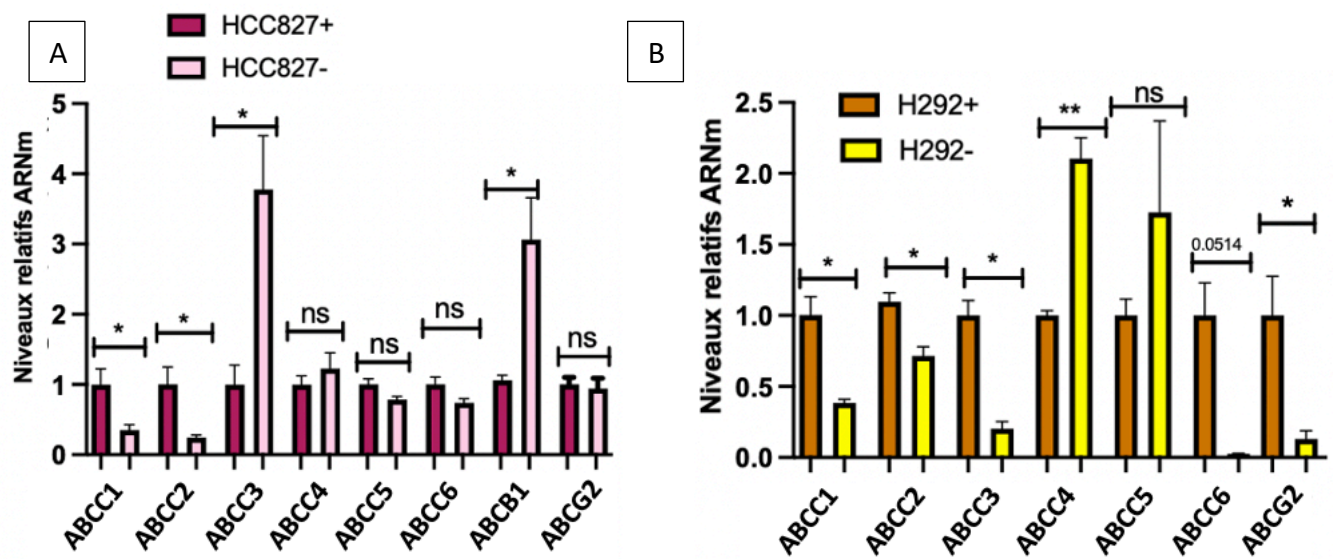


Figure S11 : MUC1 module l'expression des transporteurs à efflux de la famille ABC, dans les cellules HCC827 et H292.

Expression relative des transporteurs ABCC1 à 6, ABCB1 et ABCG2 mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules HCC827 (A) et H292 (B) exprimant ou non MUC1 (n=3). * p<0,05 ; ** p<0,01.

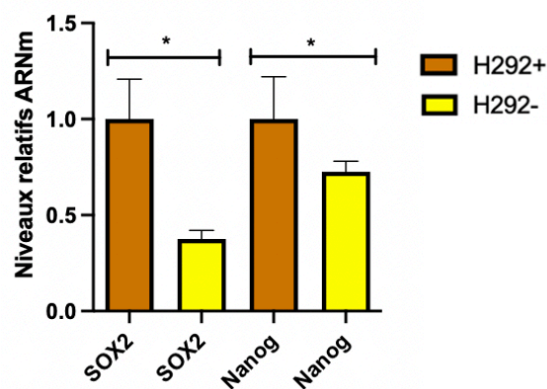


Figure S12 : MUC1 régule à la hausse l'expression relative de SOX2 et Nanog dans les cellules H292.

Expression relative mesurée par RT-qPCR selon la méthode des $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) et calculée par rapport à Ppia, dans les cellules H292 (n=3) exprimant ou non MUC1. * p<0,05 ; ** p<0,01.

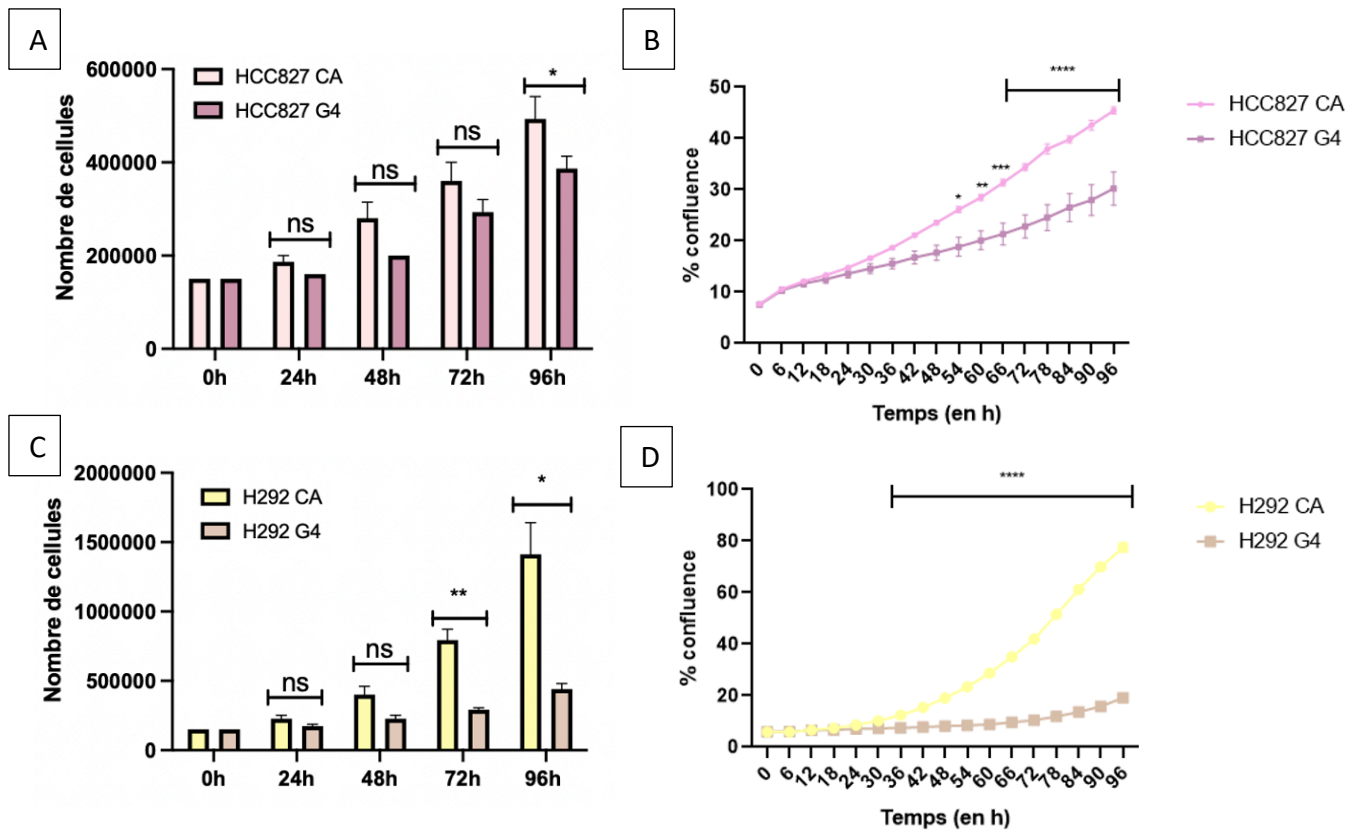


Figure S13 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue la prolifération cellulaire dans les lignées HCC827 et H292.

Après ensemencement à hauteur de 150 000 cellules par puits, les cellules HCC827 (A) et H292 (B) ont été transfectées soit avec le GapmeR contrôle (CA) soit avec le GapmeR ciblant MUC1 (G4) et ont été comptées sur cellules de Malassez toutes les 24h, pendant 4 jours (n=3). Après ensemencement à hauteur de 25 000 cellules par puits et transfection avec le GapmeR contrôle CA ou le GapmeR ciblant MUC1 G4, la confluence du tapis cellulaire a été suivie par Incucyte® avec prise de photos toutes les 6 heures pendant 4 jours, pour les cellules HCC827 (C) et H292 (D) (n=3). L'analyse a été réalisée *via* le logiciel associé à l'Incucyte®. *p<0,05 ; ** p<0,01 ; **** p<0,0001.

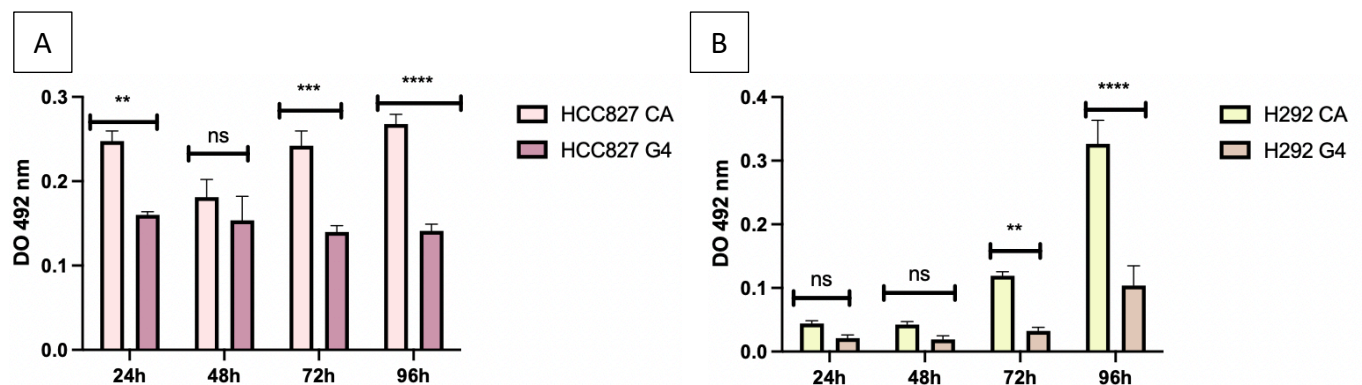


Figure S14 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue la viabilité cellulaire des cellules H292 et HCC827.

Test de viabilité (MTS) réalisé à 24, 48, 72 et 96h après ensemencement et transfection des cellules (A) HCC827, et (B) H292 (n=3). ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001.

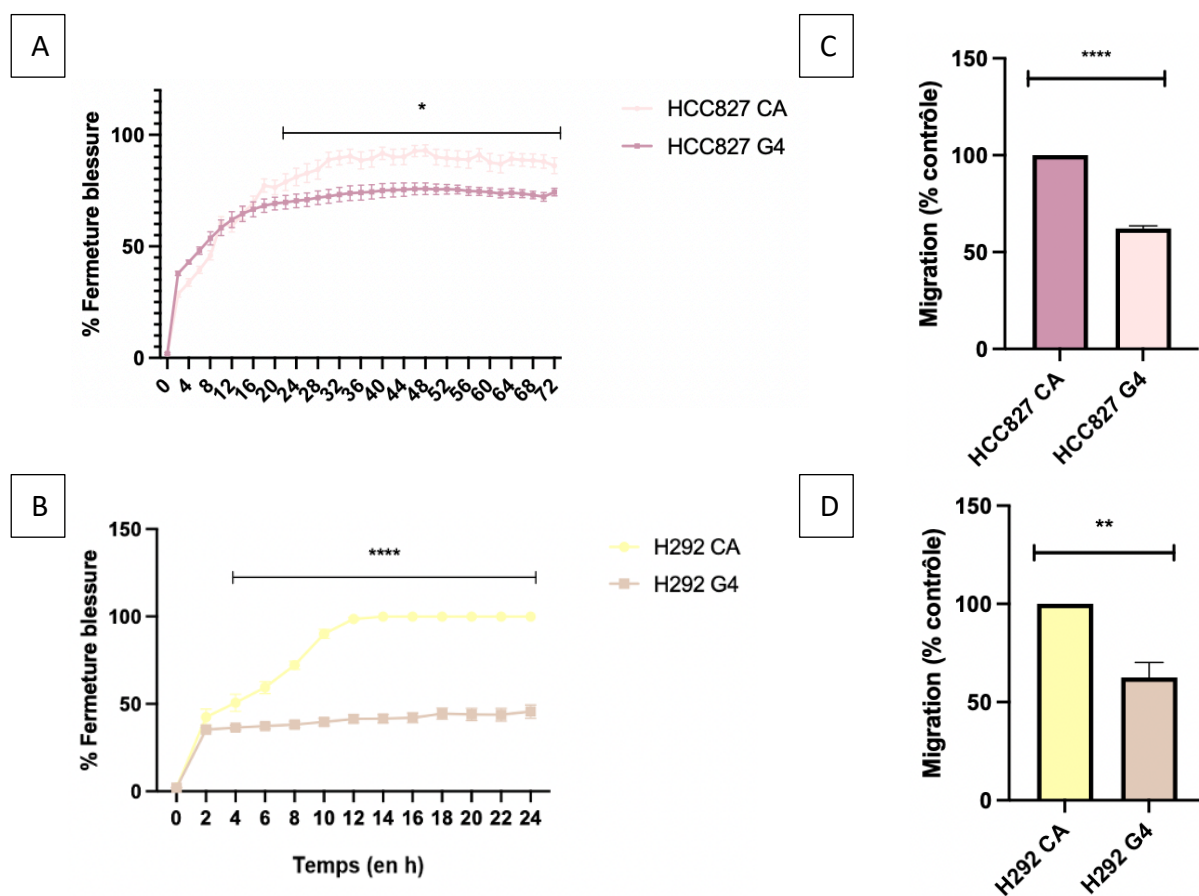


Figure S15 : Le ciblage de MUC1 par un GapmeR diminue les propriétés migratoires, des cellules HCC827 et H292.

Mesure de la confluence relative de la blessure standardisée réalisée à l'aide du WoundMarker (Essen Bioscience) dans les cellules HCC827 (A) et H292 (B) après transfection par le GapmeR CA ou G4 (n=3). Détermination des capacités migratoires des HCC827 (C) et H292 (D) par l'intermédiaire de chambres de Boyden comportant une membrane poreuse. 24h après l'ensemencement, les cellules ayant migrés ont été lysées, colorées et la fluorescence émise mesurée. La fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules ayant migrés (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

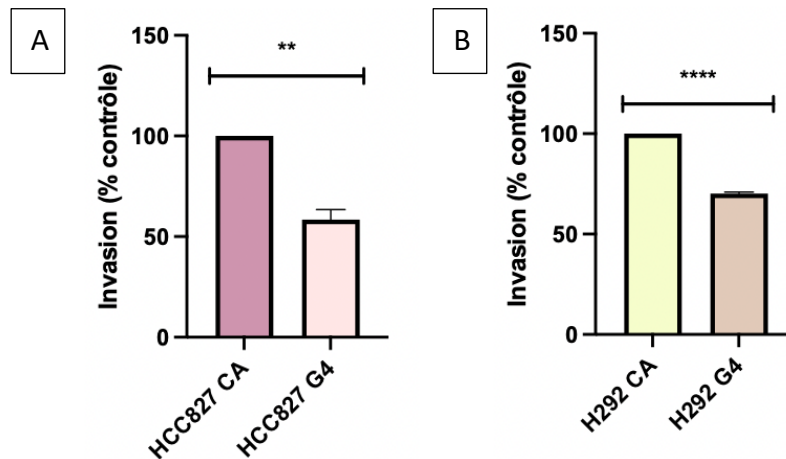


Figure S16 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue les capacités invasives, des cellules HCC827 et H292.

Mesure des capacités invasives des cellules HCC827 (A), et H292 (B) transfectées par un GapmeR contrôle ou ciblant MUC1 par l'intermédiaire de chambre de Boyden recouverte d'ECmatrix. Les cellules ayant envahi la membrane sont colorées et lysées. La fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de cellules ayant dégradés l'ECmatrix et ayant migrés vers le compartiment enrichi en SVF (n=3). ** p<0,01.

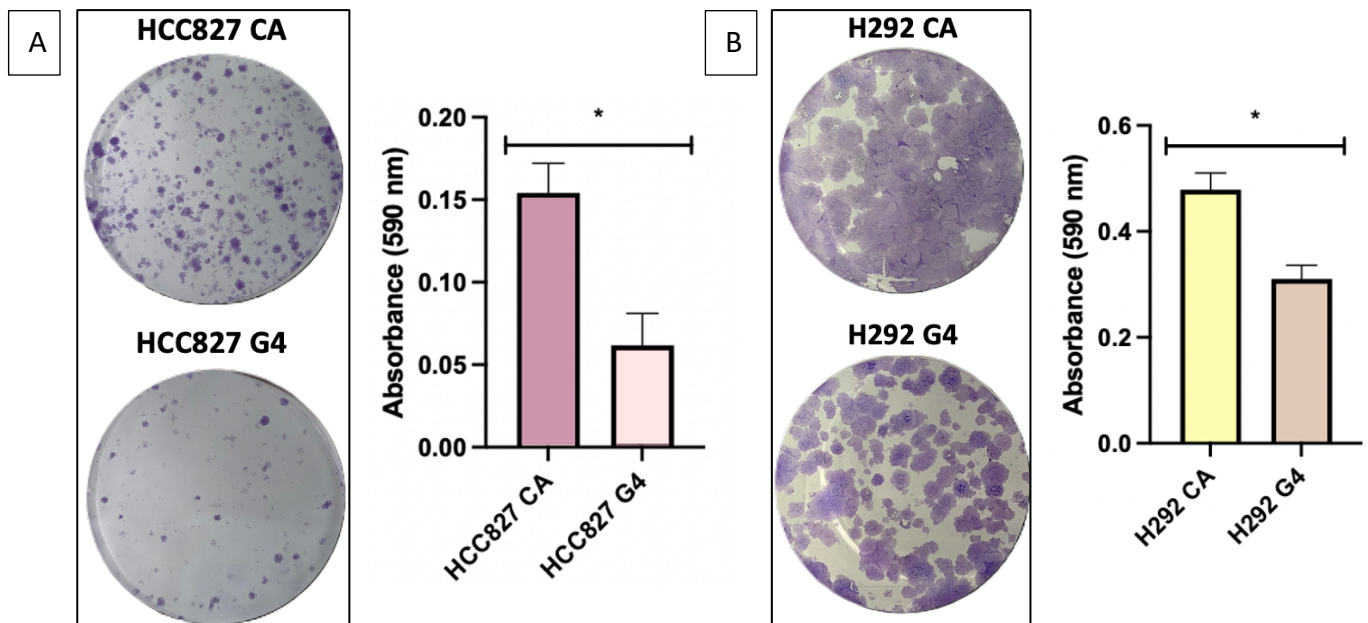


Figure S17 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR diminue le nombre de colonies formées dans les cellules HCC827 et H292.

Test de clonogénicité réalisé sur les cellules HCC827 (A) et H292 (B), après transfection par le GapmeR contrôle (CA) ou le GapmeR ciblant MUC1 (G4). Les colonies ont été colorées avec du crystal violet 14 jours après l'ensemencement. Une quantification du crystal violet fixé a été réalisée, après extraction. L'absorbance mesurée à 590 nm est proportionnelle aux nombres de colonies formées (n=3). * p<0,05.

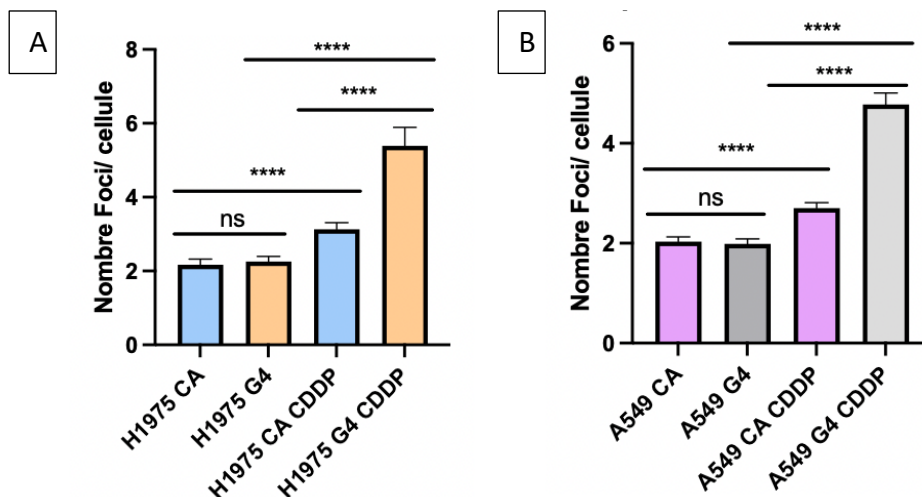
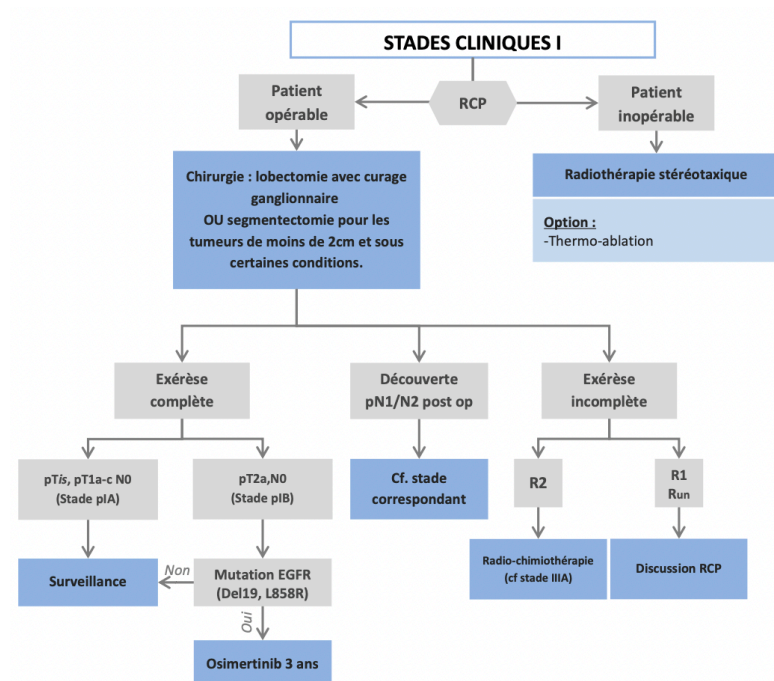


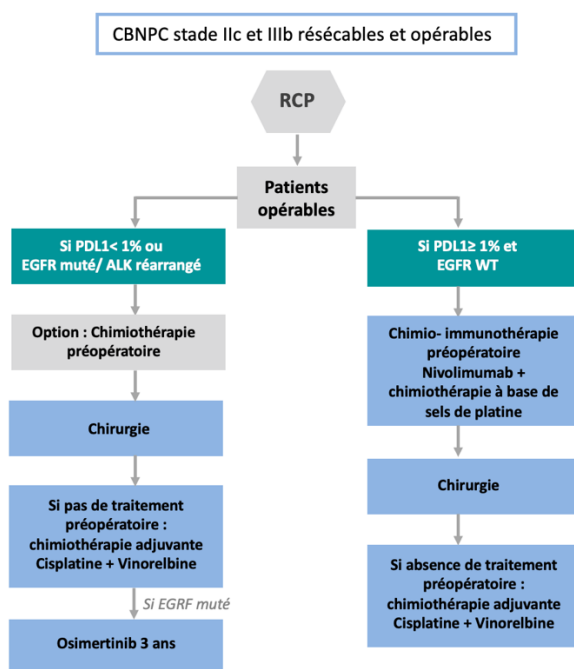
Figure S18 : Le ciblage de MUC1 par un ASO de type GapmeR augmente le nombre de foci p-ATM par cellule et donc les dommages à l'ADN induit par le cisplatine.

Dénombrement des foci p-ATM par immunofluorescence sur lame après traitement ou non au cisplatine (CDDP) 10 μ M pendant 24h, dans les lignées H1975 (A) et A549 (B) transfectées par le GapmeR contrôle CA ou ciblant MUC1 G4 (n=3). **** p<0,0001.

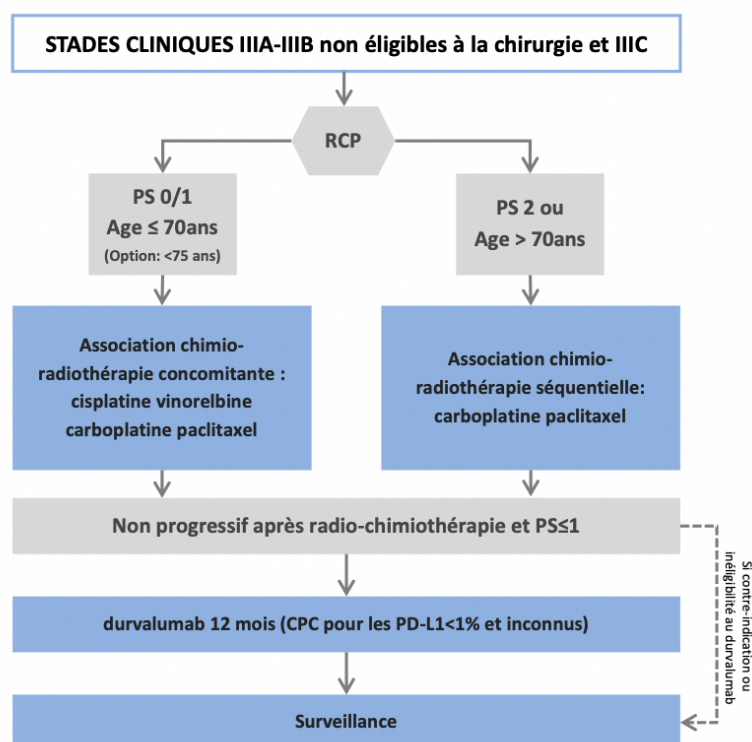
ANNEXES



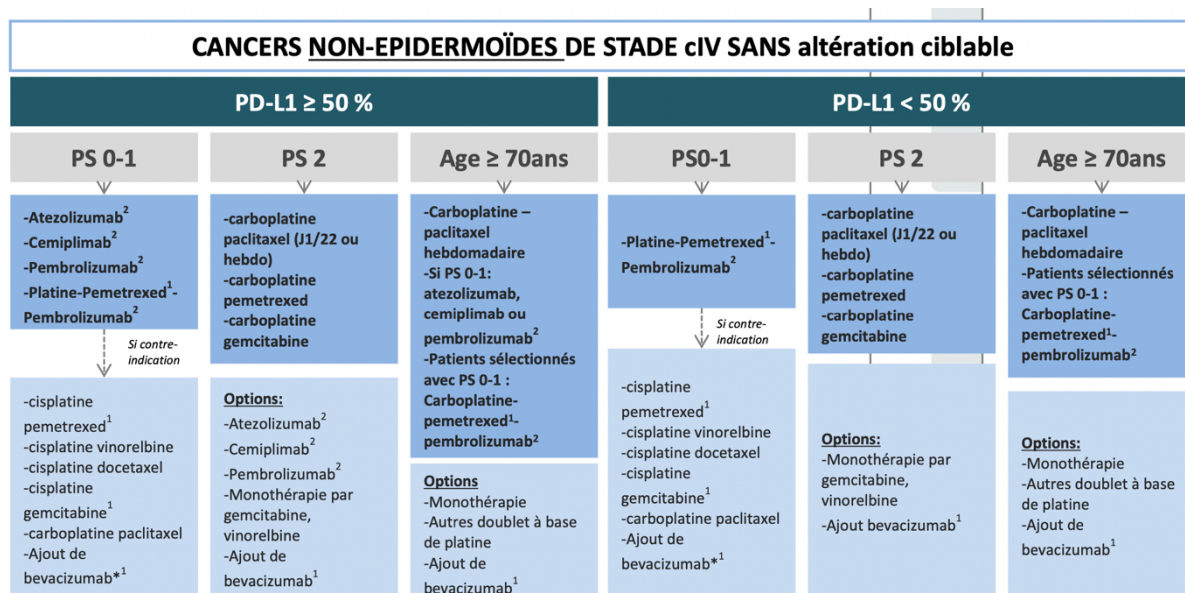
Annexe 1 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade I (d'après Couraud *et al.*, Référentiels Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique, 2024).



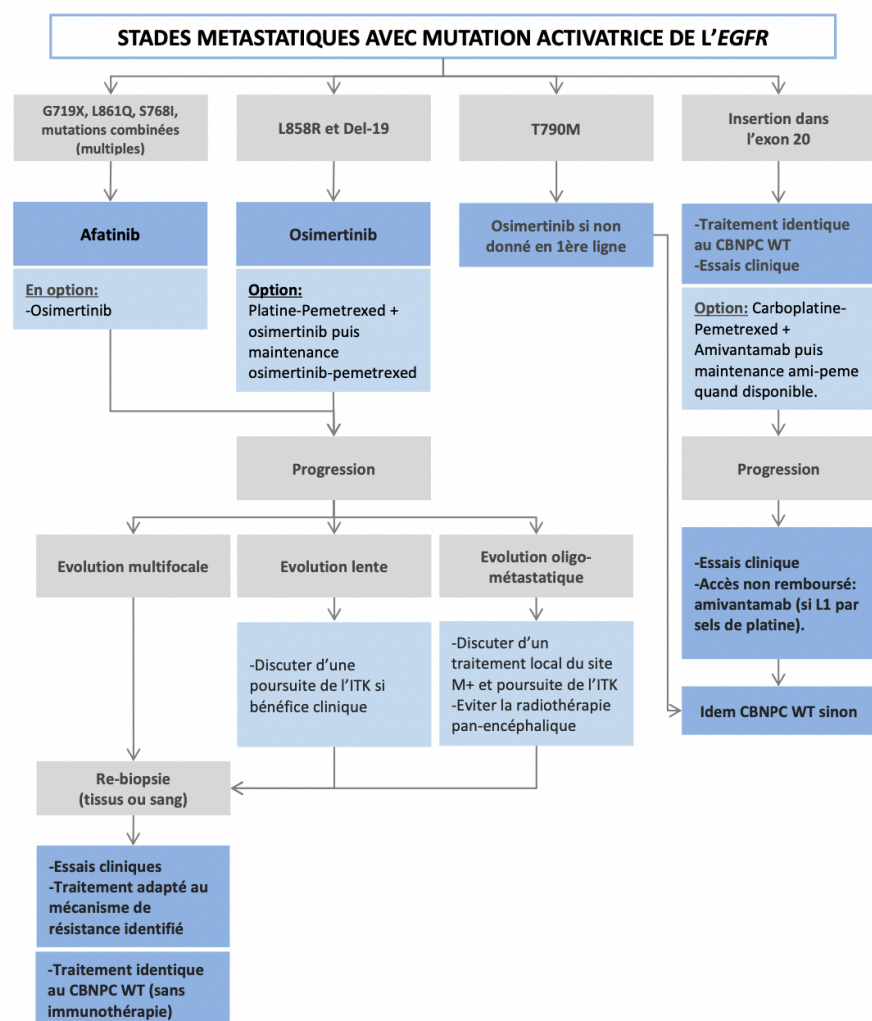
Annexe 2 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade IIc et IIIB résécables et opérables (d'après Couraud *et al.*, Référentiels Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique, 2024).



Annexe 3 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade IIIa et IIIb non éligibles à la chirurgie et IIIC (d'après Couraud *et al.*, Référentiels Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique, 2024).



Annexe 4 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade IVc sans altération ciblable (d'après Couraud *et al.*, Référentiels Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique, 2024).



Annexe 5 : Arbre décisionnel pour les CBNPCs de stade métastatique avec mutation activatrice de l'EGFR (d'après Couraud *et al.*, Référentiels Auvergne Rhône Alpes en oncologie thoracique, 2024).

APPENDICE TECHNIQUE

XIV. Matériel et Méthodes :

1) Culture cellulaire :

a) Modèles cellulaires.

L'ensemble des études ont été réalisées sur cinq lignées cellulaires de CBNPC, représentant un panel de « drivers oncogéniques » retrouvés dans les cancers du poumon non à petites cellules :

- **PC9 (MUC1-)** : lignée provenant d'un patient masculin atteint d'un adénocarcinome pulmonaire (1989). Cette lignée est mutée pour l'EGFR et est une des rares lignées cancéreuses pulmonaires à ne pas exprimer MUC1. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco™), complémenté de 10% de SVF (Gibco™), 1% de L-glutamine (Gibco™), et 1% de pénicilline et streptomycine (Gibco™).
- **H1975 (MUC1+)** : lignée d'adénocarcinome exprimant MUC1 et provenant d'une femme non fumeuse, mutée pour l'EGFR et TP53. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco™), complémenté de 10% de SVF, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline et streptomycine.
- **A549 (MUC1+)** : lignée d'adénocarcinome pulmonaire exprimant MUC1, provenant d'un homme caucasien de 58 ans et mutée K-ras. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco™), complémenté de 10% de SVF, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline et streptomycine.
- **HCC827 (MUC1+)** : lignée adénocarcinome pulmonaire exprimant MUC1 et connue pour être mutée pour l'EGFR, provenant d'une femme caucasienne de 39 ans. Cette lignée est cultivée dans du milieu RPMI (Gibco™), complémenté de 10% de SVF, 1% de L-glutamine, 1% de pénicilline et streptomycine.
- **H292 (MUC1+)** : lignée cancéreuse pulmonaire muco-épidermoïde exprimant MUC1 et provenant d'une femme de 32 ans. Cette lignée est cultivée dans du milieu RPMI (Gibco™), complémenté de 10% de SVF, 1% de L-glutamine, 1% de pénicilline et streptomycine.

b) Méthodes de culture.

Les cellules sont cultivées en milieu stérile, sous un poste de sécurité microbiologique à flux laminaire vertical. Les lignées sont contenues dans des flasques à bouchons ventilés. L'atmosphère de l'incubateur est humidifiée et chauffée à 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'air. Le milieu de culture est changé 3 fois par semaine et les cellules sont repiquées une fois par semaine. Après rinçage au PBS 1X, les cellules sont détachées de leur support grâce à une solution de trypsine-EDTA 0,05% (Gibco™), puis reprises dans un volume suffisant de milieu de culture. Elles sont, ensuite, centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm à température ambiante. Le surnageant est aspiré et les culots cellulaires sont homogénéisés dans du milieu neuf. Les cellules sont comptées sur cellule de Malassez en présence de bleu Trypan 0,4% (15250-061, Gibco™), puis ensemencées à hauteur de 0,5 x 10⁶ cellules pour une flasque T25 cm² et 1,5 x 10⁶ cellules pour une flasque T75 cm².

2) Transfection :

a) Surexpression et invalidation de MUC1.

Les transfections ont été réalisées selon les recommandations du kit « Lipofectamine® LTX & Plus Reagent » (Invitrogen™). Pour les cellules PC9, la transfection stable a été réalisée avec un plasmide codant pour MUC1 pleine longueur (MUC1FL) obtenu auprès du Dr S. Gendler (Mayo Clinic). Les cellules contrôles ont été obtenues par transfection du vecteur vide correspondant (EV). La sélection des clones d'intérêts a été faite avec du G418 (6 µL/mL) et grâce à une dilution limite. Pour les cellules H1975, A549, HCC827 et H292, la stratégie CRISPR/Cas9 a été mise en place grâce au kit « EMA (MUC1) Human Gene Knockout Kit » (Origene). Les cellules ont été transfectées avec un plasmide donneur (EF1a-GFP-P2A-Puro), et soit un plasmide scramble (cellules contrôles), soit un plasmide guide dirigé contre *MUC1* (cellules MUC1KO). La sélection a été faite par traitement à la puromycine (2 µg/mL) et dilution limite.

b) Transfection des GapmeRs.

Les cellules H1975, A549, HCC827 et H292 sont transfectées avec 25 nM de GapmeRs ciblant MUC1 ou de GapmeRs contrôles négatifs (QIAGEN®) (Tableau 6) à l'aide de la Lipofectamine® RNAimax reagent

(ThermoFisher) suivant les recommandations du fournisseur. Les analyses ont été réalisées 48 h après la transfection.

GapmeR	Séquence 5'-3'	Référence
Contrôle A (CA)	AACACGTCTATACGC	339515 LG00000002-DDA
Contrôle B (CB)	GCTCCCTTCAATCCAA	339515 LG00000001-DDA
GapmeR 1 (G1)	GAATTGAGAATGGAGT	339511 LC00823407-DDA
GapmeR 2 (G2)	TGGTAGTAGTCGGGC	339511 LC00823405-DDA
GapmeR 3 (G3)	TGTGATTGGAGGAGGT	339511 LC00823413-DDA
GapmeR 4 (G4)	GGAGAAGTGCTGTGAT	339511 LC00823409-DDA

Tableau 6 : Séquences des oligonucléotides antisens de type GapmeR testés.

3) Étude de la prolifération cellulaire :

a) Comptage sur cellules de Malassez.

Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à hauteur de 150 000 cellules par puits, dans un volume final de 2mL. Les cellules sont comptées sur cellules de Malassez après coloration au Bleu Trypan 0,4% (15250-061, Gibco™), 24h, 48h, 72h et 96h après l'ensemencement.

b) Suivi de la confluence du tapis cellulaire.

Un suivi de la prolifération a été effectué par suivi de la confluence du tapis cellulaire *via* la technologie Incucyte®. Les cellules sontensemencées à hauteur de 25 000 cellules par puits, en plaque 24 puits, dans un volume final de 1mL. La transfection des GapmeR contrôle A et GapmeR ciblant MUC1 est réalisée au moment de l'ensemencement. Une fois la plaque placée dans l'appareil, une photographie de chaque puit est prise toutes les 6 heures pendant 4 jours. Les données sont exportées et analysées par le logiciel associé à l'appareil.

4) Étude de la viabilité cellulaire :

La viabilité cellulaire a été déterminée par un test MTS.

J0 : Les cellules de chaque lignée MUC1 + et MUC1- ont étéensemencées à hauteur de 5 000 cellules pour 200 µL de milieu par puit, dans une plaque 96 puits. La transfection des GapmeR contrôle A et GapmeR ciblant MUC1 G4 est réalisée au moment de l'ensemencement. Une couronne de PBS a été faite au préalable dans les puits extérieurs, afin de limiter l'évaporation. Les plaques sont incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 24h.

Détermination des IC₅₀ :

J1 : Les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes de cisplatine (Pharmacie centrale du CHRU de Lille), de 0 à 200 µM.

J4 : 20 µL de réactif MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Prolifération Assay, Promega[®]) sont ajoutés aux 200 µL de milieu. Après incubation d'une heure à 37°C, 5% CO₂ et à l'obscurité l'absorbance à 492nm avec le SPECTRAMAX i3 (Molecular Devices) est mesurée. L'IC₅₀ a, ensuite, été calculée à l'aide du logiciel GraphPad Prism[®]. La mesure de l'absorbance pour chaque concentration permet d'établir une courbe dose/ réponse, et ainsi de calculer l'IC₅₀.

5) Étude des propriétés de migration :

a) Suivi de fermeture de blessure.

Les propriétés de migration ont été étudiées *via* la technologie Incucyte[®]. Pour cela, des plaques 96 puits ont étéensemencées à hauteur de 25 000 cellules par puits dans un volume final de 100 µL. Les plaques sont incubées dans des conditions normales de culture pendant 72h, jusqu'à confluence cellulaire dans les puits. Deux heures avant de faire la blessure, les cellules sont traitées à la Mitomycine C 10µg/mL (M4287-2MG, Sigma) de sorte à inhiber la prolifération cellulaire. Une blessure standardisée est réalisée dans chacun des puits à l'aide du Woundmaker (Essen Bioscience). Un rinçage au PBS 1X est réalisé afin d'éliminer les cellules décollées, ainsi que les éventuels débris cellulaires, puis du milieu neuf est ajouté dans chaque puits. La plaque est placée dans le système Incucyte[®], où des photos de chaque puit sont prises toutes les 2 heures, afin de suivre la fermeture de la blessure, pendant 72h. Les données obtenues sont exportées et analysées par le logiciel associé à l'appareil.

b) Chambre de Boyden

La migration cellulaire a, également, été évaluée à l'aide du kit QCM™ 24-well Cell Migration Assay Fluorometric (Merk Millipore) conformément aux recommandations du fournisseur. Ce test est réalisé en chambres de Boyden contenant une membrane présentant des pores de 8µM. Les cellules sontensemencées à hauteur de 50 000 cellules dans du milieu (DMEM ou RPMI Gibco™, complémenté de 1% de L-glutamine Gibco™ et de 1% de pénicilline et streptomycine Gibco™) appauvri en sérum SVF (1%). De l'autre côté de la membrane poreuse, un milieu complet riche en sérum (10%) a été ajouté, de manière à favoriser la migration des cellules à travers la membrane poreuse, par chimioattraction. Après 24h d'incubation à 37°C et 5% CO₂, les chambres sont retirées et les cellules n'ayant pas traversées la membrane sont éliminées. Les cellules ayant traversées sont dissociées de la membrane par incubation dans un tampon de détachement cellulaire puis lysées par ajout d'un tampon de lyse et colorées par le CyQuant GR Dye®. La fluorescence émise est mesurée par le SPECTRAMAX i3 (Molecular Devices), à l'aide des filtres 480/520 nm et est proportionnelle à la quantité de cellules ayant migré.

6) Étude des propriétés invasives :

L'invasion cellulaire a été évaluée à l'aide du kit QCM™ 24-well Cell Invasion Assay Fluorometric (Merk Millipore) conformément aux recommandations du fournisseur. Ce test est réalisé en chambres de Boyden contenant une membrane présentant des pores de 8µM et recouverte d'ECmatrix®, imitant la membrane basale. Les cellules sontensemencées à hauteur de 50 000 cellules dans du milieu (DMEM ou RPMI Gibco™, complémenté de 1% de L-glutamine Gibco™ et de 1% de pénicilline et streptomycine Gibco™) appauvri en sérum SVF (1%). De l'autre côté de la membrane poreuse, un milieu complet riche en sérum (10%) a été ajouté, afin de favoriser la dégradation de la matrice et le mouvement des cellules à travers la membrane poreuse, par chimioattraction. Après 24h d'incubation à 37°C et 5% CO₂, les chambres sont retirées et les cellules n'ayant pas traversées la membrane sont éliminées. Les cellules ayant traversées sont dissociées de la membrane par incubation dans un tampon de détachement cellulaire puis sont lysées par ajout d'un tampon de lyse et colorées par le CyQuant GR Dye® (ThermoFisher Scientific). La fluorescence émise est mesurée par le SPECTRAMAX i3 (Molecular Devices), à l'aide des filtres 480/520 nm et est proportionnelle à la quantité de cellules ayant dégradé la matrice et envahi la membrane.

7) Étude de la clonogénicité :

Les cellules sontensemencées à hauteur de 500 cellules par puits dans une plaque 6 puits. Après 15 jours, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% (sc-281692, Santa Cruz Biotechnology) et

colorées avec 0,5% de crystal violet. Après incubation avec de l'acide acétique 10%, le crystal violet est extrait et l'absorbance à 590nm est mesurée par le SPEXTRAMAX I3 (Molecular Devices). Pour les tests effectués sur les cellules transfectées par les GapmeR CA et G4, les cellules sont transfectées au moment de l'ensemencement et 7 jours plus tard.

8) Immunofluorescence :

Les cellules sont ensemencées à raison de 50 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits sur une lamelle en verre. Les cellules sont transfectées par les différents GapmeR au moment de l'ensemencement des puits. 24h plus tard, les cellules sont traitées ou non au cisplatine pendant 24h à 10µM ou 14 µM suivant la lignée considérée. Par la suite, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15 min (sc-281692, Santa Cruz), puis perméabilisées grâce à une solution de Triton X100 à 0,1% (EuroMedex) pendant 10 min. Afin de saturer les sites non spécifiques, les cellules sont incubées avec une solution de BSA à 3% (Bovine Serum Albumin, Euromedex) pendant 30 min à température ambiante. Les échantillons fixés, perméabilisés et saturés, sont incubés sur la nuit à 4°C avec un anticorps primaire dirigé contre MUC1 (ab109185, Abcam, dilution 1/500^e) ou γH2AX (Ser139, 05636, Merck Millipore, dilution 1/500^e) ou p-ATM (05-740, Merck Millipore, dilution 1/500^e) ou Ki67 (Cell signaling #9129, dilution 1/1000^e) puis avec un anticorps secondaire fluorescent pendant 45min à température ambiante (AlexaFluor™ 568 goat anti-mouse A11004, Invitrogen™, dilution 1/1000^e ; AlexaFluor™ 555 goat anti-rabbit A21429, Invitrogen™, dilution 1/500^e). Les noyaux sont colorés au DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol) (D9542, Sigma, dilution 1/10 000^e) pendant 5min à température ambiante. Les lames sont montées avec une solution de montage (Glycergel Mounting Medium, Dako) et conservées à 4°C, à l'obscurité. L'Apotome (ZEISS Apotome.2) est utilisé pour collecter des images, qui sont analysées *via* le logiciel Image J.

9) Étude de l'expression protéique :

a) *Extraction protéique.*

Les cellules ont été ensemencées et traitées ou non 48h après avec du cisplatine (PC9/H1975 : 10µM ; A549 : 14 µM) pendant 24h. Par la suite, les cellules sont récupérées : le milieu est aspiré et le tapis cellulaire est rincé au PBS 1X. Les cellules sont grattées manuellement dans du PBS 1X, centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min et les culots cellulaires obtenus sont lysés dans 150 µL de tampon RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 150 nM NaCl ; 1% NP40 ; 1% Sodium desoxycholate et 0,1% SDS) supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (Complete Minitablet, Roche). Les

échantillons sont conservés à -20°C. La lyse a été suivie d'une centrifugation à 4°C à 14 000rpm pendant 8 min. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C.

b) Dosage protéique.

Le dosage des protéines totales a été réalisé selon la technique BCA (acide bicinchoninique) selon les recommandations du fournisseur (Pierce). L'absorbance est mesurée à 570 nm par le Multiskan FC (Thermo Scientific).

c) Western Blot.

Après le dosage de la concentration en protéines, 10µg de protéines ont été ajoutées dans un mélange réactionnel contenant 2µL de SRA 10X (Sample Reducing Agent, Invitrogen™), 5µL de LDS 4X (Lithium Dodecyl Sulfate, Invitrogen™) et une quantité suffisante d'eau pour atteindre un volume final de 20µL. La dénaturation a été faite pendant 5 min à 95°C. Les échantillons préparés ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 4-12% (NuPage, Invitrogen™). Pour repérer la taille des protéines, des marqueurs de poids moléculaires sont utilisés (Novex 3µL et Magic mark 3µL, Invitrogen™). La migration a été faite pendant 1h à 150V, dans un tampon MOPS 1X (SDS Running buffer, Invitrogen™).

Le transfert sur membrane de nitrocellulose (Premium 0.2 µm NC, Amersham™Protan™) a été réalisé grâce au Trans-Blot®Turbo™ Transfer System (Bio-rad™), en milieu humide contenant 20ml Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfert buffer, 20ml d'éthanol absolue et 60ml d'eau. L'efficacité du transfert a été visualisée par une coloration au Rouge Ponceau. La membrane de nitrocellulose a ensuite été saturée sur la nuit, par une solution de lait écrémé dilué à 5% dans du TBS-T (Tris Buffer Saline - Tween 20 0,05%). Après 3 lavages au TBS-T, la membrane a été incubée avec les dilutions d'anticorps primaires décrites dans le Tableau 7, sur la nuit à 4°C sous agitation. Après 3 nouveaux lavages au TBS-T, la membrane a été incubée 45 min à température ambiante, avec une dilution d'anticorps secondaire au 1/10 000^e dans du TBS-T. La révélation a été réalisée grâce au kit SuperSignal (Pierce) et Clarity Max™ Western ECL (Bio-rad™) puis l'acquisition a été faite grâce au Fusion FX (Vilber).

Anticorps Primaire	Référence	Dilution	Anticorps Secondaire	Dilution
MUC1 CT	Ab109185 (Abcam)	1/500	Anti- Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
β actine	13E5 (Cell signaling technology)	1/10 000	Anti- Mouse (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
γH2AX (Ser 139)	05-636 (EMD Millipore)	1/1000	Anti- Mouse (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
PARP1-c	Ab32138 (Abcam)	1/1000	Anti- Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
53BP1	NBP2-25028 (Novus technology)	1/1000	Anti- Mouse (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
Bax (B-9)	SC7480 (Santa Cruz)	1/1000	Anti- Mouse (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
p-AKT (S473)	#9271 (Cell Signaling)	1/1000	Anti- Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
AKT (pan)	#4691 (Cell Signaling)	1/1000	Anti- Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
Caspase 3 clivée	#9661 (Cell Signaling)	1/1000	Anti- Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
Erk 1/2	#9102 (Cell Signaling)	1/1000	Anti- Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
p-ERK1/2	#4370 (Cell Signaling)	1/2000	Anti- Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000
P21	#2947 (Cell Signaling)	1/1000	Anti- Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1/10 000

Tableau 7 : Références des anticorps utilisés en western blot.

10) RT-qPCR :

a) Extraction ARN totaux à partir de culture cellulaire.

Les ARN totaux ont été extraits grâce au kit « NucleoSpin® miRNA » (Macherey-Nagel) et dosés par spectrophotométrie (Nanodrop).

b) RT-qPCR.

La rétro-transcription des ARN en ADNc a été réalisée selon les recommandations du kit « High capacity cDNA Reverse Transcription kit » (Invitrogen™). Le programme suivant est utilisé sur le thermocycleur MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad™) : dénaturation initiale à 90 °C pendant 10 min suivie d'une hybridation à 37 °C pendant 120 min, puis une élongation pendant 5 min à 85 °C.

Ensuite, la technologie TaqMan® est utilisée suivant les recommandations du fournisseur dans un thermocycleur couplé à un lecteur optique (StepOne Plus, Thermo Fisher Scientific). Le programme suivant est utilisé : 2 min à 50 °C, 10 min à 95 °C, suivi de 39 cycles de 15 sec à 95 °C et 60 sec à 60 °C. Les différentes sondes utilisées sont présentées dans le tableau 8. L'expression relative des ARNm est calculée d'après la méthode de $\Delta\Delta CT$ et normalisée par PPIA. Le facteur d'expression relative est donné par la relation mathématique $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Sondes Humaines	Référence	Sondes Humaines	Référence
MUC1	HS00159357	SLC22A2 (OCT2)	HS01010726
ABCC1	HS01561504	SLC22A3 (OCT3)	HS01009571
ABCC2	HS00960489	ATP7A	HS01105094_m1
ABCC3	HS00978452	ATP7B	HS01075310
ABCC4	HS00988721	CD274 (PD-L1)	HS00204257
ABCC5	HS00981089	IL4	HS00174122
ABCC6	HS01081203	IL13	HS00174379
ABCB1	HS00184500	IL10	HS00961622
ABCG2	HS01053790	SOX2	HS04234836
SLC31A1 (CTR1)	HS00977266	Nanog	HS04234836
SLC22A1 (OCT1)	HS00427552	PPIA	HS02387400

Tableau 8 : Référence des sondes TaqMan® utilisées.

11) Essais Comètes :

Les cellules PC9 et H1975 traitées au cisplatine 10µM et A549 traitées au cisplatine 14µM pendant 24h, ont été suspendues (60 000 cellules/mL) dans de l'agarose à faible fusion (1613111, Bio-Rad™) à 0,5% dans du PBS. La suspension a ensuite été immédiatement étalée sur une lame pour essai comète (4250-200-03, R&D Systems). L'agarose contenant les cellules a été mis à refroidir pendant 20 minutes à 4°C et à l'obscurité. Ensuite, les membranes cellulaires ont été perméabilisées avec une solution de lyse (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 [pH 10]) à 4°C pendant 1 heure et à l'obscurité. Les lames ont ensuite été équilibrées dans un tampon d'électrophorèse (pH 12,3 : 2 mM EDTA, pH ajusté à 12,3 avec NaOH) pendant 20 min à 4°C et à l'obscurité. Ensuite, les lames ont été soumises à un champ d'électrophorèse de 2,06 V/cm (98 V et environ 150 mA dans un système d'électrophorèse où les électrodes sont distantes de 47,5 cm) pendant 5 minutes à 4°C (toujours à l'obscurité). La migration électrophorétique a été stoppée en neutralisant le pH dans un bain d'eau froide pendant 10 minutes. L'ADN a été coloré avec du SYBR Green (S7563, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) pendant 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité, selon les recommandations du fabricant. Après coloration, les lames sont observées et photographiées grâce au microscope Apotome (Zeiss). Les images ont été analysées grâce au logiciel ImageJ, où la tête (le noyau) et la queue (ADN ayant migré) de chaque comète ont été délimités pour obtenir l'intensité de fluorescence de la tête, l'intensité de fluorescence de la queue et la longueur de celle-ci. Ces données ont permis de déterminer le « Tail moment », proportionnel à la quantité de dommages à l'ADN, à l'aide de la formule suivante :

(longueur queue comète x intensité de fluorescence queue comète) / intensité totale de fluorescence (tête + queue).

12) Détermination Activité des Caspases 3/7

a) Caspase 3/7 Glo® Assay.

Les cellules sontensemencées à hauteur de 15 000 cellules par puits en plaque 96 puits blanche à fond transparent, dans un volume final de 100 µL. La transfection des cellules avec le GapmeR contrôle ou ciblant MUC1 est réalisée au moment de l'ensemencement. 24h après, les cellules « assays » sont traitées au cisplatine pour une durée de 24h. Par la suite, le traitement au cisplatine est stoppé en laissant la plaque s'équilibrer à température ambiante. Le réactif caspase 3/7 Glo® (Promega) reconstitué, selon les recommandations du fournisseur, est ajouté dans chaque puit. La plaque est centrifugée à 300/500 rpm pendant 30s, puis elle est incubée, à l'obscurité, pendant 1h à température ambiante. La luminescence émise est mesurée au SPECTRAMAX i3 (Molecular Devices).

b) Détermination de la concentration protéique.

La concentration protéique de chaque puit a été déterminé à l'aide du kit CyQuant GR Dye (ThermoFisher Scientific). Les cellules sontensemencées à hauteur de 15 000 cellules par puits en plaque blanche 96 puits à fond transparent, dans un volume final de 100 µL. La transfection des cellules avec le GapmeR contrôle ou ciblant MUC1 est réalisée au moment de l'ensemencement. 24h après, les cellules « assays » sont traitées au cisplatine pour une durée de 24h. Le milieu est ensuite aspiré et les réactifs du kit ajouté dans chaque puit selon les recommandations du fournisseur. La plaque est incubée 15min à température ambiante et à l'obscurité. La fluorescence émise est alors mesurée au SPECTRAMAX i3 (Molecular Devices) à l'aide d'un jeu de filtres 480/520 nm.

13) Évaluation de l'activité des pompes à efflux :

L'activité des pompes à efflux à large spectre de la famille ABC a été évaluée en cytométrie en flux à l'aide du kit EFFLUX-ID Gold (ENZO Technologies) selon les recommandations du fournisseur. Le composé EFFLUX-ID Gold® est un composé fluorescent qui entre dans la cellule par diffusion passive et qui sera efflué de la cellule spécifiquement par les pompes de la famille ABC. Les cellules sont cultivées dans des conditions de culture standards et le milieu doit être changé 24h avant le dosage. Les cellules sont rincées au PBS 1X, trypsinisées puis décollées. Après centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min, le

culot cellulaire est repris dans du milieu complet sans rouge phénol à hauteur de 2 000 000 cellules/mL. Le composé EFFLUX-ID Gold® est ajouté à la suspension cellulaire et les tubes sont incubés 30 min à 37°C. Juste avant le passage dans le cytomètre, 5µL d'iodure de propidium sont ajoutés. Les analyses sont réalisées sur le cytomètre CytoFLEX (Beckman Coulter). La fluorescence mesurée est inversement proportionnelle à l'activité des pompes de la famille ABC : plus la fluorescence mesurée est élevée, moins les pompes sont actives et plus la fluorescence mesurée est faible, plus les pompes sont actives.

14) Analyses statistiques :

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8®. La significativité des résultats a été mesurée à l'aide de tests statistiques de Student où les variances ont été considérées comme égales. Le seuil de significativité a été fixé à $p = 0,05$. Dans ce projet, les résultats sont présentés sous la forme moyenne $\pm$ SEM (Standar Error of the Mean). Les degrés de significativité sont notés de la manière suivante : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$.

ARTICLE EN 1^{er} AUTEUR

Résumé et contexte :

Le carcinome rénal à cellules claires (CRCC), le sous type histologique majeur du cancer du rein, a fait l'objet de plusieurs études au sein de notre équipe. Dans ces différents travaux, il a été mis en évidence que miR-21, un ARN non codant, voyait son expression régulée à la hausse, *in vitro* et *in vivo*, dans le CRCC, et que cette surexpression est associée à la progression tumorale, à la résistance aux traitements mais également à l'accumulation anormale de lipides au sein des cellules. En effet, miR-21 possède la capacité de réguler l'expression du récepteur activé par le proliférateur de peroxydases- α (PPAR- α), élément clé dans la régulation du métabolisme lipidique. Partant de ces données préliminaires, j'ai donc pu participer à l'étude du rôle de miR-21, sur la régulation de PPAR- α dans le CRCC, à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit, au cours de mes premiers mois de thèse.

Sur une cohorte de 52 échantillons de CRCC, nous montrons que la surexpression de miR-21 est corrélée significativement à une diminution de l'expression de PPAR- α . Des études *in vitro*, par RT-qPCR, par immunoprécipitation de la chromatine, et par western blotting sur deux lignées cellulaires de carcinome rénal à cellules claires (ACHN et 786-O) ont été menées. Nous montrons que la surexpression de PPAR- α (i) diminue l'expression de miR-21, en diminuant l'activité transcriptionnelle d'AP-1 et NF- κ B ainsi que leur liaison avec le promoteur de miR-21 et (ii) augmente l'expression de PTEN et de PDCD4 (Programmed cell death protein 4), deux intermédiaires protéiques favorisant l'apoptose et la dégradation protéique. Lorsque nos deux modèles cellulaires ont été transfectés avec un pre-miR-21, la surexpression de miR-21 induit une diminution de l'expression de PPAR- α ainsi que de l'activité transcriptionnelle médiée par PPAR- α . *A contrario*, lorsque les deux modèles cellulaires ont été transfectés avec un anti-miR-21 (LNA-21), l'expression de PPAR- α a été augmentée ainsi que celle de ses différentes cibles impliquées dans l'oxydation des acides gras.

Au final, dans cette étude, nous avons pu montrer une boucle de rétrocontrôle négative entre miR-21 et PPAR- α . Compte tenu de nos résultats, le ciblage thérapeutique de miR-21 représente une stratégie potentiellement intéressante pour restaurer les fonctions de PPAR- α afin de limiter l'accumulation intracellulaire d'acide gras et d'inhiber les événements oncogènes médiés par le métabolisme lipidique aberrant du CRCC.

Article

A Double-Negative Feedback Interaction between miR-21 and PPAR- α in Clear Renal Cell Carcinoma

Marine Goujon ^{1,†}, Justine Woszczyk ^{1,†}, Kelly Gaudelot ¹, Thomas Swierczewski ¹ , Sandy Fellah ¹, Jean-Baptiste Gibier ^{1,2} , Isabelle Van Seuning ¹ , Romain Larrue ^{1,3}, Christelle Cauffiez ¹ , Viviane Gnemmi ^{1,2} , Sébastien Aubert ^{1,2}, Nicolas Pottier ^{1,3} and Michaël Perrais ^{1,*}

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277—CANTHER—Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France; marine.goujon@univ-lille.fr (M.G.); justine.woszczyk@gmail.com (J.W.); kelli@hotmai.fr (K.G.); thomas.sw@hotmail.fr (T.S.); sandy.fellah@univ-lille.fr (S.F.); jeanbaptiste.gibier@chru-lille.fr (J.-B.G.); isabelle.vanseuning@inserm.fr (I.V.S.); romain.larrue@univ-lille.fr (R.L.); christelle.cauffiez@univ-lille.fr (C.C.); viviane.gnemmi@chru-lille.fr (V.G.); sebastien.aubert@chru-lille.fr (S.A.); nicolas.pottier@univ-lille.fr (N.P.)

² CHU Lille, Service d'Anatomo-Pathologie, F-59000 Lille, France

³ CHU Lille, Service de Toxicologie et Génopathies, F-59000 Lille, France

* Correspondence: michael.perrais@inserm.fr; Tel.: +33-3-20-29-88-62

† These authors equally contributed to this work.

Simple Summary: Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the main histotype of kidney cancer, which is typically highly resistant to conventional systemic therapies and also known for abnormal lipid accumulation. Identifying the actors and deciphering the molecular mechanisms that lead to tumor progression is an important step in the development of new therapeutic strategies to cure ccRCC. In this context, we focused our attention on miR-21, an oncogenic miRNA upregulated in many solid tumors, and peroxysome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α), the master regulator of lipid metabolism and one target of miR-21. In this study, our data show a double-negative feedback interaction between PPAR- α and miR-21. Thus, miR-21 silencing could be therapeutically exploited to restore PPAR- α expression and consequently inhibit the oncogenic events mediated by the aberrant lipid metabolism of ccRCC.

Abstract: Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the main histotype of kidney cancer, which is typically highly resistant to conventional therapies and known for abnormal lipid accumulation. In this context, we focused our attention on miR-21, an oncogenic miRNA overexpressed in ccRCC, and peroxysome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α), one master regulator of lipid metabolism targeted by miR-21. First, in a cohort of 52 primary ccRCC samples, using RT-qPCR and immunohistochemistry, we showed that miR-21 overexpression was correlated with PPAR- α downregulation. Then, in ACHN and 786-O cells, using RT-qPCR, the luciferase reporter gene, chromatin immunoprecipitation, and Western blotting, we showed that PPAR- α overexpression (i) decreased miR-21 expression, AP-1 and NF- κ B transcriptional activity, and the binding of AP-1 and NF- κ B to the miR-21 promoter and (ii) increased PTEN and PDCD4 expressions. In contrast, using pre-miR-21 transfection, miR-21 overexpression decreased PPAR- α expression and transcriptional activity mediated by PPAR- α , whereas the anti-miR-21 (LNA-21) strategy increased PPAR- α expression, but also the expression of its targets involved in fatty acid oxidation. In this study, we showed a double-negative feedback interaction between miR-21 and PPAR- α . In ccRCC, miR-21 silencing could be therapeutically exploited to restore PPAR- α expression and consequently inhibit the oncogenic events mediated by the aberrant lipid metabolism of ccRCC.

Keywords: miR-21; PPAR- α ; renal cancer; ccRCC; lipid; NF- κ B; AP-1; transcriptional regulation



Citation: Goujon, M.; Woszczyk, J.; Gaudelot, K.; Swierczewski, T.; Fellah, S.; Gibier, J.-B.; Van Seuning, I.; Larrue, R.; Cauffiez, C.; Gnemmi, V.; et al. A Double-Negative Feedback Interaction between miR-21 and PPAR- α in Clear Renal Cell Carcinoma. *Cancers* **2022**, *14*, 795. <https://doi.org/10.3390/cancers14030795>

Academic Editor: Evgeny Yakirevich

Received: 22 December 2021

Accepted: 31 January 2022

Published: 4 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

An aberrant metabolism is a hallmark of tumors [1], and alterations in lipid metabolism represent one of the most important features of renal cell carcinoma (RCC), especially the clear cell type (ccRCC), which accounts for 70–85% of all RCC cases [2]. Renal neoplastic cells harness lipid metabolism to sustain uncontrolled proliferation, avoid cell death, and seed in secondary organs. Although ccRCC is known for abnormal lipid accumulation of cholesterol, cholesterol esters, and neutral lipids (triglycerides) [3], the underlying molecular mechanisms remain unclear. Furthermore, most patients with ccRCCs harbor chromosomal 3p loss and genomic mutations in the Von Hippel–Lindau Tumor Suppressor (VHL) allele, followed by the secondary loss of multiple tumor suppressor genes including PBRM1, SETD2, PTEN, and/or TP53 [4–7]. ccRCCs are also known to be highly resistant to conventional cytotoxic, radiation, and hormone therapies, and nephrectomy is the only therapeutic option used to cure early and local ccRCCs. At diagnosis, 25% of patients present a metastatic disease, and one third develop metastasis after surgery. The current treatment options offered to metastatic patients include inhibitors of (i) tyrosine kinases, (ii) mTORC signaling, and (iii) immune control checkpoints. Despite the initial response, most metastatic ccRCC patients will develop resistance to these targeted therapies [4–7]. Therefore, deciphering the molecular mechanisms underlying renal tumor progression is urgently needed to develop new therapeutic strategies to cure ccRCC.

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs of 19–22 nucleotides in length that repress translation and/or induce degradation of target genes, typically by binding to their 3'-UTR. miRNAs are major regulators of gene expression and are involved in a variety of biological processes such as differentiation, proliferation, metabolism, and apoptosis [8,9]. Furthermore, the aberrant expression of miRNAs has been shown to play a causative role in many human diseases, and specific miRNA expression patterns have been associated with the initiation and progression of various complex diseases including cancer.

miR-21, one of the earliest miRNAs identified as an “OncomiR” [10], is the most commonly upregulated miRNA in both solid and hematological malignancies [11]. In our previous works, we provided evidence that miR-21 represents an attractive therapeutic target in renal cancer given its multifaceted and central role in the molecular and cellular events associated with renal cancer progression and drug resistance [12]. Nevertheless, whether miR-21 also contributes to the dysregulation of lipid metabolism in cancer cells is currently poorly understood.

Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α), the master regulator of lipid metabolism, is a nuclear receptor that acts as a ligand-activated transcription factor. PPAR- α activates numerous enzymatic pathways involved in fatty acid (FA) uptake, intracellular transport, FA activation and β -oxidation, and lipoprotein/cholesterol metabolism [13,14]. PPAR- α regulates the expression level of its targets in a transcriptional manner through heterodimerization with the retinoid X receptor (RXR). Once activated by a ligand, this complex binds to the peroxisome proliferator response element (PPRE) located in the promoter region of the target genes and modulates their transcription. PPAR- α can also negatively regulate transcription mediated by AP-1 and NF- κ B by protein–protein interactions. Interestingly, PPAR- α is an established target of miR-21 [15–17], and AP-1 and NF- κ B have been shown to be involved in the transcriptional control of miR-21 [18,19], thus suggesting a negative regulatory loop between miR-21 and PPAR- α . Herein, we provide evidence for this regulatory mechanism by showing (i) the concomitant altered expression of both PPAR- α and miR-21 in a cohort of 52 primary ccRCCs, (ii) the transcriptional regulation of miR-21 by PPAR- α through decreased binding of AP-1 and NF- κ B to the miR-21 promoter, and (iii) the increased transcriptional activity and expression of PPAR- α and key enzymes involved in FA oxidation (FAO) following miR-21 silencing.

2. Material and Methods

2.1. Clinical Specimen

A total of 52 primary ccRCC samples with healthy tissues were collected after surgery and stored in the Tumor Bank and Tissue Collection of the Department of Pathology of Lille Hospital. A written consent form was obtained from each patient, and the study was approved by the scientific committee of the institute Tumorothèque du CHRU de Lille (approval number: CSTMT078). The cohort has been previously described in [12]. All the procedures performed in the studies involving human participants were carried out in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and the Declaration of Helsinki 1964 and its later amendments or comparable ethical standards.

2.2. Immunohistochemistry

The immunohistochemistry protocol for PPAR- α (clone ab8934, abcam, Paris, France; 1/200) was performed as previously described [20,21]. An IgG control antibody was used for immunohistochemical analysis and did not show specific staining.

2.3. Cell Lines and Culture Conditions

The HK-2 human proximal tubule epithelial cell line, ACHN, and 786-O human renal cancer cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The RCC10 and RCC4 human renal cancer cell lines were a gift from Dr. D. Bernard (Inserm U1052—CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France) [22]. The ACHN, 786-O, and RCC10/RCC4 cells were cultured, respectively, with MEM, DMEM, and RPMI-1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin, while the HK2 cells were cultured with Keratinocyte Serum-Free Medium supplied with 0.05 mg/mL Bovine Pituitary Extract, 5 ng/mL human recombinant epidermal growth factor, and 1% penicillin/streptomycin. The cells were treated with 400 nM or 1 mM of GW7647, a highly selective agonist of PPAR- α (Merck, Darmstadt, Germany).

2.4. Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from the tissue and cell samples with the RecoverAll Total Nucleic Acid isolation kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and the miRNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), respectively.

2.4.1. Mature miRNA Expression

Retrotranscription was performed on 5 ng of total RNA with a TaqMan probe (hsa-miR-21: 000397; RNU6B: 001093; RNU48: 001006 (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystem, Illkirch-Graffenstaden, France) according to TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit protocol (Applied Biosystem). The qPCR reaction was performed using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) following the manufacturer's protocol using the CFX96 Real-Time PCR system (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France). The miRNA expression data were normalized to the expression of RNU6B for the tissue samples and to the expression of RNU48 for the cell samples. The expression levels of mature miR-21 were calculated based on the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) [23].

2.4.2. Gene Expression

Retrotranscription was performed on 1 μ g of total RNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystem, Illkirch-Graffenstaden, France). The expression levels of PPAR- α , ACOX1, CPT1, and SLC22A5 were analyzed using the TaqMan Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). The qPCR reaction was performed using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) following the manufacturer's protocol using the CFX96 Real-Time PCR system (Bio-Rad). The mRNA expression data were normalized

to the expression of PPIA (cyclophilin A). The expression levels of mature miR-21 were calculated based on the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) [23].

2.5. Western Blotting

Total cellular extracts and Western blotting were performed as previously described [24] using specific primary antibodies: PPAR- α (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), PTEN (Cell Signaling), PDCD4 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA); β -Actin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Peroxydase-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) were used, and immunoreactive bands were visualized using the West Pico chemoluminescent substrate (Thermo Scientific, Pierce, Illkirch-Graffenstaden, France). Chemo-luminescence was visualized using an LAS4000 apparatus (Fujifilm, Courbevoie, France). The original Western Blotting data is shown in Supplementary Materials (Figure S1).

2.6. Transient Transfections

Transient transfections and co-transfections were performed with Lipofectamine LTX (Invitrogen) as previously described [16]. The plasmids used in this study were: pSG5-EV (empty vector), pSG5-PPAR- α (a gift from Professor B. Staels, Inserm U1011, CHU de Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille, France), pGL3-miR-21-Luc (−1656/+24) miR-21 promoter, [18], κ B-Luc, AP1-Luc, and J6-PPRE-TK-Luc (a gift from Professor B. Staels). To determine the promoter activity, 24 or 48 h after transfection, the cell lysates were determined for firefly and *Renilla* luciferase activities with the Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France). The results were expressed as relative luciferase units normalized to *Renilla* luciferase [25].

2.7. Chromatin Immunoprecipitation

The 786-O and ACHN cells (1.0×10^6) were fixed for 10 min at room temperature in 1% (*v/v*) formaldehyde and processed for ChIP analysis as previously described [26]. The specific antibodies used were: anti-c-jun (D) and anti-NF- κ B p65 (H-286) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). qPCR was performed using the SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad) and the following primers: AP-1 Forward: 5'-TAAGGATGACGCACAGATTGTC-3'; AP-1 Reverse: 5'-TCAGAAAGTCCCACATTATCACC-3'; NF- κ B Forward: 5'-GGAGTGGATGGGTCTGCCTTA-3'; and NF- κ B Reverse: 5'-CAAGGTGGATTGCATCGAGG-3'.

2.8. Modulating miR-21 Expression in Renal Cancer Cells

In order to upregulate miR-21 expression and downregulate miR-21 expression in renal cancer cells, premiR hsa-miR-21-5p (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and miRCURY LNA Inhibitor hsa-miR-21-5p (Exiqon, Vedbaek, Denmark) were transfected, respectively. The control cells were transfected with premiR miRNA Precursor Molecules-Negative Control #2 (Ambion) or with miRCURY LNA Power Inhibitor Control (Exiqon) [12]. Reverse transfection was performed with Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) according to the manufacturer's instruction.

2.9. Statistical Analysis

The data are presented as means $\pm$ SEM (standard error mean). The statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences between multiple groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test. Statistical differences between each two groups were determined by the Student's *t*-test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. miR-21 Overexpression Is Correlated with the Downregulation of PPAR- α Expression in Clear Renal Cell Carcinoma

First, using RT-qPCR, we examined miR-21 and PPAR- α expression in 52 paired ccRCC tumor tissues and matched adjacent non-tumor tissues. miR-21 expression was significantly upregulated in ccRCC tissues compared to the normal renal tissues (14.48 ± 2.6 vs. 0.97 ± 0.1 , respectively; $p < 0.001$; Figure 1A), whereas PPAR- α expression was significantly decreased (0.16 ± 0.03 vs. 1.03 ± 0.12 , respectively; $p < 0.001$; Figure 1B). Then, we showed that miR-21 overexpression was correlated with PPAR- α downregulation in ccRCC (Spearman's test: $r = -0.32$; $p = 0.0208$; Figure 1C). The immunohistochemistry analyses showed very low expression of PPAR- α in neoplastic cells except in a few ccRCC low-grade tumors (nucleolar grade 1–2 as described by the World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP)) (Figure 1D). Furthermore, in a few ccRCC high-grade tumors (nucleolar grade 3–4), a nuclear expression of PPAR- α was observed, mainly restricted to tumor-infiltrated inflammatory cells, in particular lymphocytes (Figure 1D). Overall, cancer cells in ccRCC exhibited high levels of miR-21, and the expression of PPAR- α was nearly undetectable.

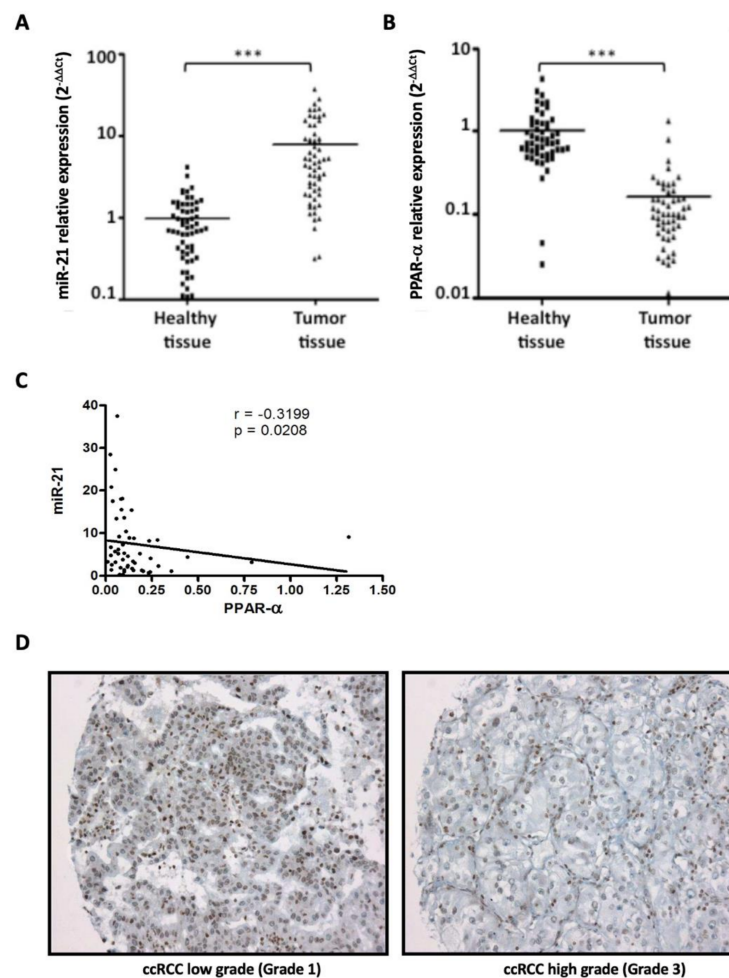
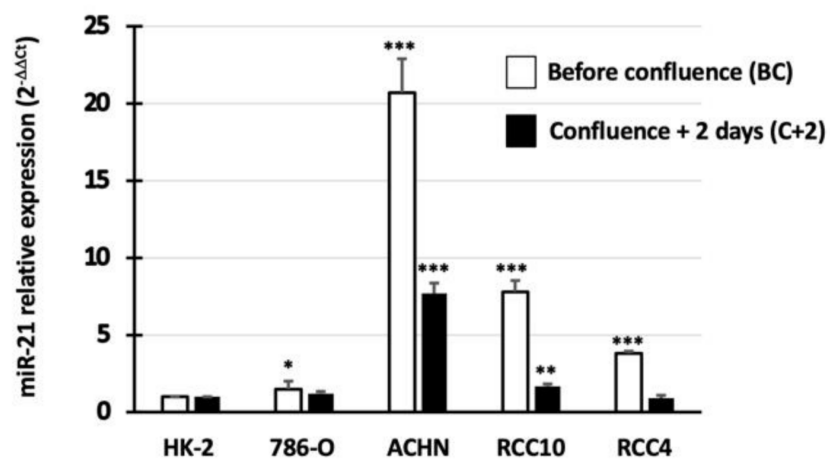


Figure 1. miR-21 is significantly upregulated and PPAR- α downregulated in ccRCC human tissues compared to the paired healthy tissues. (A) miR-21 and (B) PPAR- α expressions in the tumor and adjacent healthy renal tissues of a cohort of 52 cRCC patients were determined by qRT-PCR. RNU6B and PPIA were used as internal controls, respectively. The average expression of miR-21 and PPAR- α in ccRCC is shown in relation to the value obtained for normal kidney tissue (** $p < 0.001$). (C) The correlation between miR-21 and PPAR- α expressions in ccRCC was analyzed with Spearman's test. (D) The immunohistochemistry study preformed using an anti-PPAR- α antibody (magnification: $\times 200$).

3.2. miR-21 and PPAR- α Expressions in Renal Cellular Models

To further investigate the relationship between miR-21 and PPAR- α , we first assessed the expression level of miR-21 and PPAR- α in human proximal tubule epithelial cell line HK-2 and in four human ccRCC cell lines. Using RT-qPCR, we showed that miR-21 expression was significantly upregulated before confluence in the 786-O, ACHN, RCC10, and RCC4 cancer cell lines compared to HK-2 cells ($p < 0.05$ and $p < 0.001$; Figure 2A). The ACHN cells expressed high level of miR-21 (21-fold, $p < 0.001$), whereas 786-O expressed lower levels (1.7-fold, $p < 0.05$) compared to HK-2 cells. Two days after the cells reached confluence, miR-21 expression decreased in all the cancer cell lines; however, the Western blot analysis revealed induction of PPAR- α (Figure 2B). Therefore, variation in miR-21 expression directly impacts PPAR- α levels only in ccRCC cell models.

A



B

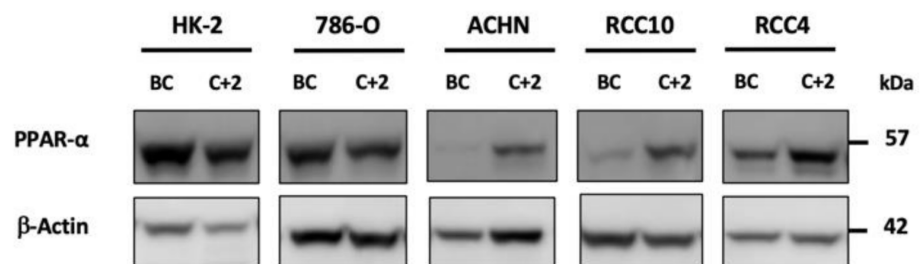


Figure 2. miR-21 and PPAR- α expressions in HK-2 and renal cancer cell lines before confluence (BC) and two days after confluence (C + 2). (A) Using RT-qPCR, miR-21 expression was determined in the 786-O, ACHN, RCC10, and RCC4 renal cancer cells as compared to normal HK-2 renal epithelial cells. RNU48 was used as an internal control. The values are means $\pm$ SEM and represent at least three separate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$). (B) Western blotting was performed on whole cell extracts. Antibodies against PPAR- α and β -actin were used.

3.3. PPAR- α Expression and/or Activation Decreases the Expression of miR-21

To investigate whether the modulation of PPAR- α activity can modulate the expression of miR-21, ccRCC cell models were exposed to GW7647, a highly selective PPAR- α agonist, and also transiently transfected by the pSG5-PPAR- α expression vector containing PPAR- α cDNA without a putative miR-21 binding site in its 3'-UTR. In ACHN cells that expressed a high level of miR-21, PPAR- α activation by GW7647 had no effect on miR-21 expression, whereas PPAR- α overexpression significantly decreased miR-21 levels (32–41% inhibition,

$p < 0.05$; Figure 3A). In 786-O cells that expressed a very low level of miR-21, GW7647 alone was sufficient to significantly decrease miR-21 expression (42–48% inhibition, $p < 0.05$ and $p < 0.01$; Figure 3A). Similarly, the forced expression of PPAR- α also decreased miR-21 expression by 39% ($p < 0.01$), but no additive effect was observed when the cells were treated with the PPAR- α agonist. In conclusion, variation in PPAR- α expression and/or activity is able to decrease miR-21 expression in renal cancer cells.

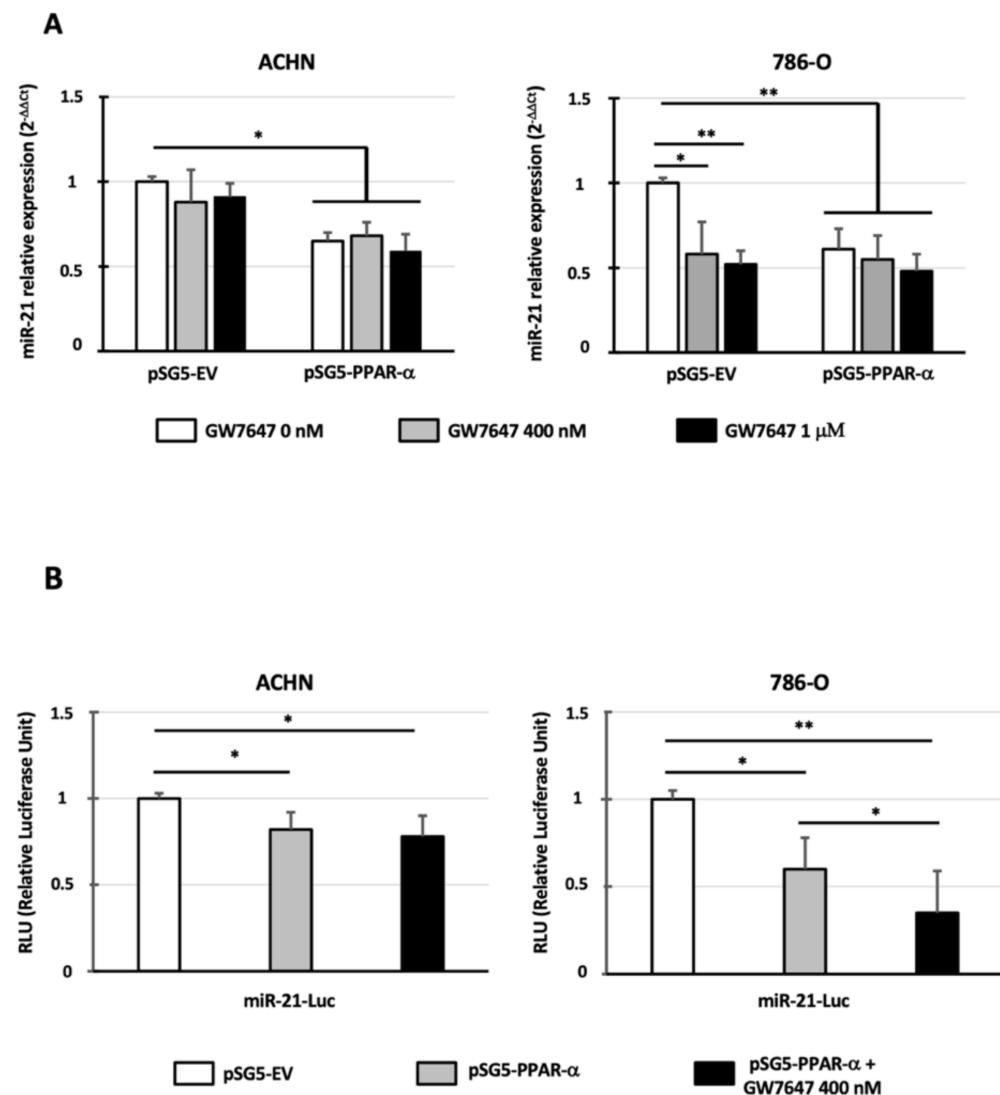


Figure 3. PPAR- α expression and/or activation decreases miR-21 expression and transcription. (A) ACHN and 786-O cells were transfected with pSG5-EV (empty vector) or pSG5-PPAR- α expression vectors. At 24 h after transfection, the cells were incubated with 0, 400 nM, or 1 μ M of GW7647. At 48 h after transfection, miR-21 expression was determined by qPCR. RNU48 was used as an internal control. (B) ACHN and 786-O cells were co-transfected with miR-21-Luc promoter and pSG5-EV (empty vector) or pSG5-PPAR- α expression vectors. At 24 h after transfection, the cells were incubated with 0 or 400 nM of GW7647. At 48 h after transfection, luciferase activity was determined. The values obtained with the empty vector were referred to as 1. The values are means $\pm$ SEM and represent at least four separate experiments (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

3.4. PPAR- α Expression and/or Activation Decreases the Expression of miR-21 at the Transcriptional Level

To further define how PPAR- α downregulates miR-21, we cloned the −1656/+24 miR-21 promoter described by Fujita et al. [18] in a pGL3 basic luciferase reporter vector. The co-transfection experiments performed in the ACHN and 786-O cells showed that

PPAR- α overexpression decreased miR-21 promoter transcriptional activity (18% and 40% inhibition, respectively; Figure 3B). This inhibition increased significantly after the GW7647 treatment only in the 786-O cells (65% inhibition). Thus, PPAR- α overexpression decreases miR-21 promoter transcriptional activity in renal cancer cells.

3.5. PPAR- α Expression and/or Activation Decreases AP-1 and NF- κ B Transcriptional Activity and Binding to miR-21 Promoter

Then, we focused our attention on the AP-1 and NF- κ B transcription factors that (i) regulate miR-21 transcriptional activity [18,19], (ii) interact with those whose transcriptional activity is inhibited by PPAR- α via a transrepressive mechanism [8], and (iii) are overexpressed and activated in renal carcinogenesis [27,28]. To determine AP-1 and NF- κ B activities in our cellular models, we investigated AP-1- and NF- κ B-dependent transcription directly using AP1-Luc and κ B-Luc reporter assays. In the ACHN cells, PPAR- α overexpression significantly decreased transcriptional activity mediated by AP-1 and NF- κ B ($\approx 20\%$ inhibition, $p < 0.05$; Figure 4A), but GW7647 had no effect. In the 786-O cells, PPAR- α overexpression significantly decreased transcriptional activity mediated by AP-1 and NF- κ B (32 and 55% inhibition, respectively, $p < 0.001$; Figure 4A). The treatment with the PPAR- α agonist increased transcriptional activity mediated by AP-1 (62% inhibition, $p < 0.001$). Then, we determined whether PPAR- α overexpression influenced the binding of AP-1 and NF- κ B on the miR-21 promoter. In the control conditions (pSG5-EV), the ChIP assays showed that, in the ACHN and 786-O cells, AP-1 interacted with the miR-21 promoter when we compared the chromatin enrichment in anti-c-jun and IgG conditions (7.2 ± 1.9 and 3.2 ± 0.8 , respectively; $p < 0.01$). These interactions ceased when PPAR- α was overexpressed (pSG5-PPAR- α). The same results were obtained with the NF- κ B transcription factor: in the ACHN and 786-O cells transfected with pSG5-EV, chromatin enrichment was observed in anti-NF- κ B p65 vs. IgG conditions (4.1 ± 1.6 ($p < 0.05$) and 6.09 ± 1.5 ($p < 0.01$), respectively), whereas no significant enrichment was observed when the cells were transfected with the pSG5-PPAR- α expression vector. In conclusion, PPAR- α expression decreases AP-1 and NF- κ B transcriptional activity and binding to miR-21 promoter.

3.6. PPAR- α Expression and/or Activation Increases the Expression of Two miR-21 Targets: PDCD4 and PTEN

After showing that PPAR- α decreased miR-21 expression directly at the transcriptional level, we evaluated the impact of PPAR- α overexpression and activation on the expression levels of two known miR-21 targets: PDCD4 and PTEN. In the ACHN and 786-O cells, PPAR- α overexpression increased PDCD4 (2.5-fold (Figure 5A) and 2.2-fold (Figure 5B)) and PTEN (2.5-fold (Figure 5A) and 2.9-fold (Figure 5B)) expression levels. Similar results were obtained when the cells were exposed to GW7647. Altogether, these results suggest that PPAR- α positively regulates PDCD4 and PTEN expressions.

3.7. Inhibition of miR-21 Expression Increases PPAR- α and PPAR- α Target Gene Expression

To further define how miR-21 downregulates PPAR- α , anti-miR-21 (LNA-21) or pre-miR-21 was transfected in the 786-O cells to either inhibit or overexpress miR-21, respectively [7]. Using RT-qPCR, PPAR- α expression was not affected when miR-21 was overexpressed or downregulated (data not shown). However, using Western blotting (Figure 6A), we showed that miR-21 downregulation using an LNA-21 strategy increases PPAR- α expression (1.3-fold), whereas miR-21 overexpression by transfection of pre-miR-21 decreases its expression (55% inhibition). Then, we evaluated the impact of miR-21 expression on PPAR- α signaling. First, we used the J6-PPRE-TK-Luc reporter plasmid in which the luciferase gene was under the control of the thymidine kinase promoter containing three PPRE elements. When the J6-PPRE-TK-Luc construct was co-transfected with LNA-21, luciferase activity was increased by 1.9-fold ($p < 0.05$) compared to LNA-C (Figure 6B). In both co-transfection conditions, the treatment with GW7647 significantly increased luciferase activities (3.8-fold and 4.2-fold, respectively; $p < 0.001$). By contrast, when the cells were co-transfected with J6-PPRE-TK-Luc and pre-miR-21, GW7647 had

no effect on transcriptional activity mediated by PPAR- α . Then, to confirm that miR-21 plays a role in transcriptional activity mediated by PPAR- α , we evaluated the expression of three PPAR- α target genes involved in lipid metabolism: SLC22A5, CPT1, and ACOX1. When miR-21 was inhibited by LNA-21, their expression levels significantly increased (2.8-, 2.1-, and 2.9-fold, respectively; $p < 0.01$) (Figure 6D). In conclusion, miR-21 overexpression decreases PPAR- α expression and transcriptional activity mediated by PPAR- α .

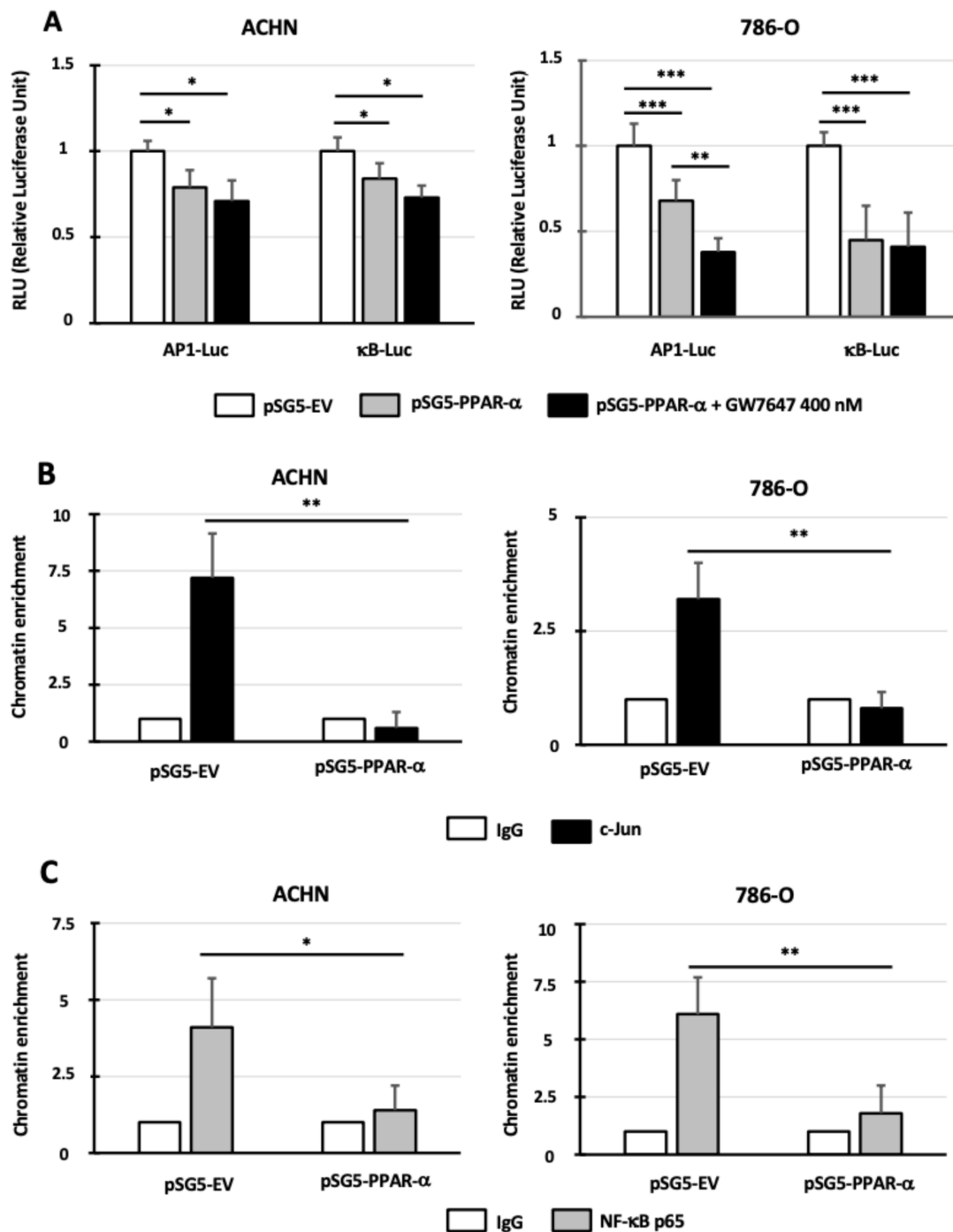


Figure 4. PPAR- α expression and/or activation decreases AP-1 and NF- κ B transcriptional activity and binding to miR-21 promoter. (A) ACHN and 786-O cells were co-transfected with pSG5-EV (empty vector) or pSG5-PPAR- α expression vectors and κ B-Luc or AP1-Luc synthetic promoters. At 24 h after transfection, the cells were incubated with 0 or 400 nM of GW7647. At 48 h after transfection, luciferase activity was measured. Luciferase activity in cells transfected with pSG5-EV was set as 1.

(B,C) Soluble chromatin from the ACHN and 786-O cells transfected with pSG5-EV or pSG5-PPAR- α expression vectors was immunoprecipitated with control immunoglobulin G (IgG) and anti-c-jun (B) or anti-NF- κ B p65 antibodies (C). The precipitated DNA samples were amplified by PCR with pairs of primers flanking the binding site regions for AP-1 and NF- κ B. The results were expressed as the percentage of input. The values obtained with the empty vector were referred to as 1. The values are means $\pm$ SEM and represent at least three separate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

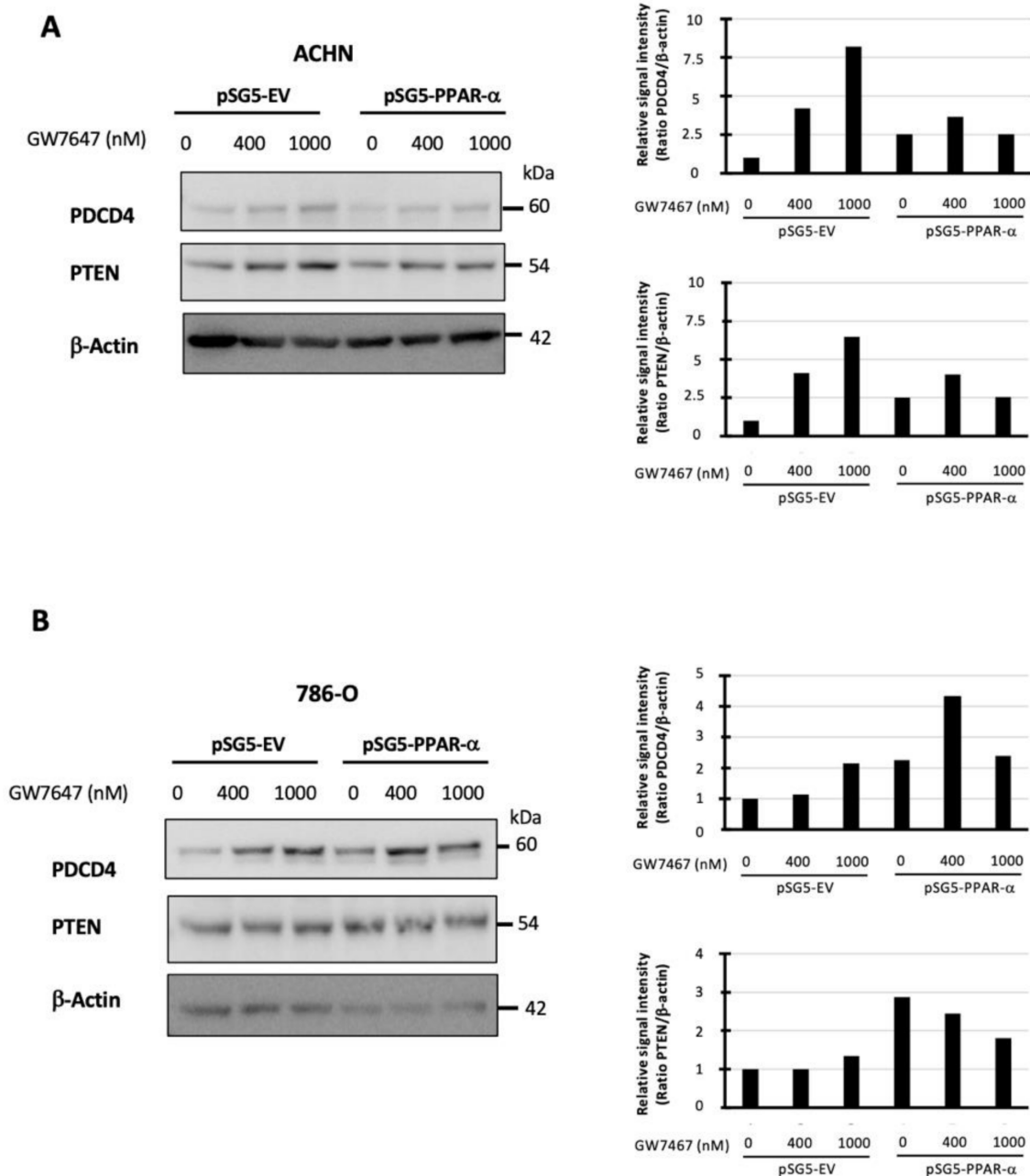


Figure 5. PPAR- α expression and/or activation increases the expression of two miR-21 targets: PDCD4 and PTEN in ACHN (A) and 786-O cells (B). Western blot performed on cell extracts obtained from ACHN and 786-O transfected with pSG5-EV (empty vector) or pSG5-PPAR- α expression vectors and treated for 24h after transfection with 0, 400 nM, or 1 μ M of GW7647. The intensities of the signal were determined by densitometric scanning, expressed as the relative signal PDCP4/Actin and PTEN/Actin ratios and represented as histograms. Expression in the “pSG5-EV with no treatment” condition was arbitrarily set to 1.

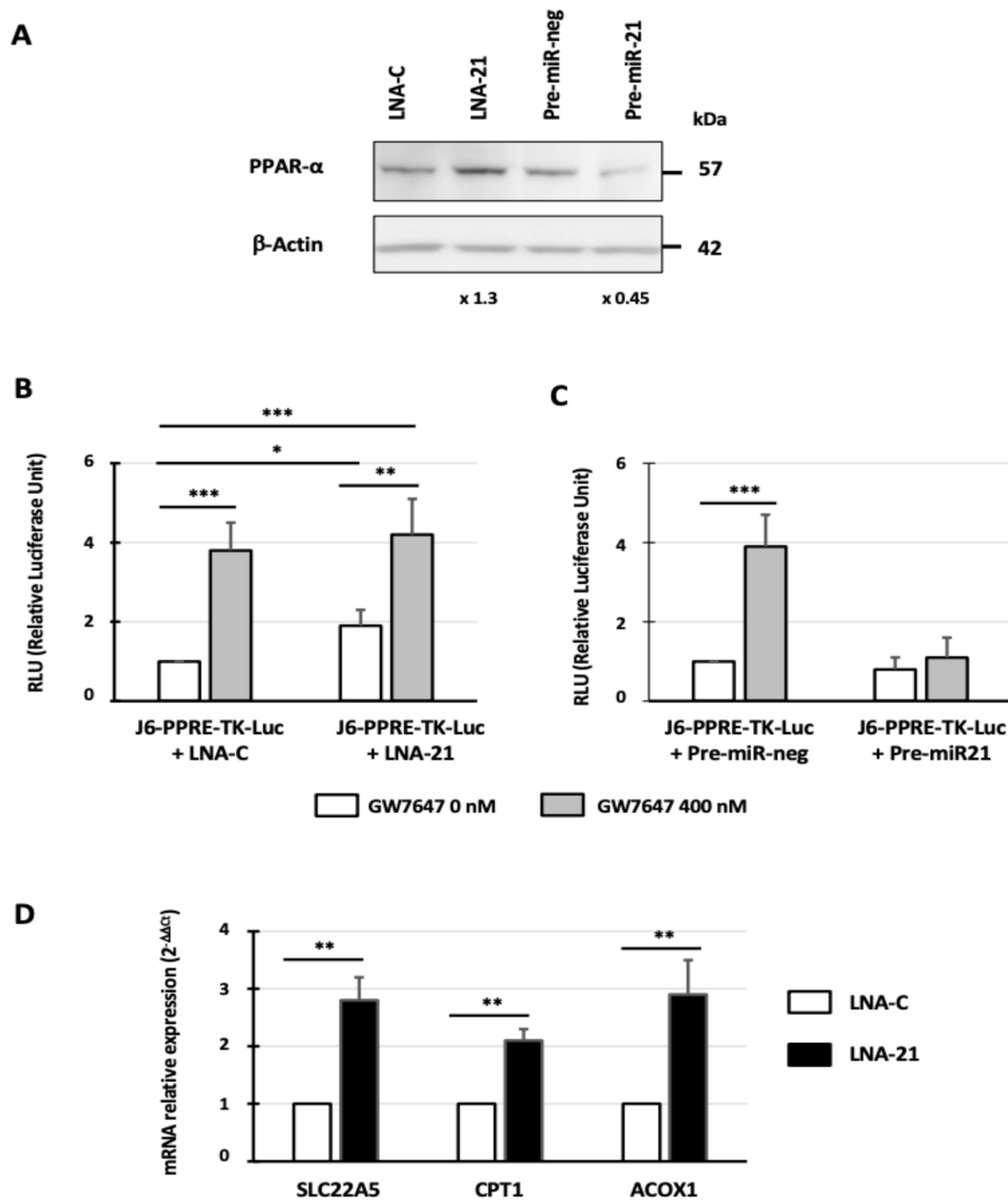


Figure 6. Inhibition of miR-21 expression increases PPAR-α and PPAR-α target gene expressions in 786-O cells. (A) Western blot performed on cell extracts obtained from 786-O cells transfected for 24h with 10 nM of LNA-C, LNA-anti-miR-21 (LNA-21), pre-miR-neg, or pre-miR-21. (B) The 786-O cells were co-transfected with J6-PPRE-TK-Luc reporter plasmid and 10 nM of LNA-C or LNA-anti-miR-21 (LNA-21). At 48 h after transfection, luciferase activity was measured. Luciferase activity in the cells co-transfected with J6-PPRE-TK-Luc and LNA-C was set as 1. (C) The 786-O cells were co-transfected with J6-PPRE-TK-Luc reporter plasmid and 10 nM of pre-miR-neg or pre-miR-21. At 48 h after transfection, luciferase activity was measured. Luciferase activity in the cells co-transfected with J6-PPRE-TK-Luc and pre-miR-neg was set as 1. (D) The 786-O cells were transfected with 10 nM of LNA-C or LNA-anti-miR-21 (LNA-21). At 48 h after transfection, SLC22A5, CPT1, and ACOX1 expressions were determined by RT-qPCR. PPIA was used as an internal control. The values are means ± SEM and represent at least three separate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

4. Discussion

Studies over the last decade have led to the concept that ccRCC, the most common and deadly type of cancer affecting the kidney, is a metabolic disease histologically characterized by large intracellular lipid deposits [3]. As ccRCC is typically highly resistant to conventional systemic therapies [2,5–7], the identification of new molecular mechanisms driving tumor progression is essential for the rational design of new therapeutic strategies to cure ccRCC. In this context, we focused our attention on miR-21, an established oncogenic miRNA commonly upregulated in many solid tumors such as breast, lung, and stomach cancers and hematological malignancies [10,11]. Mechanistically, miR-21 has been shown to influence cancer by targeting essential tumor-suppressive genes such as PTEN, BCL2, or PDCD4, thereby promoting tumor development by regulating many distinct carcinogenic pathways including those related to proliferation, apoptosis, angiogenesis, and metastasis [29]. For example, we previously showed that miR-21 is not only upregulated in ccRCC but is also involved in cancer progression (proliferation, migration, and invasion) and resistance to chemotherapy by controlling the expression of genes associated with multi-drug resistance and the apoptotic pathway [12]. Nevertheless, whether miR-21 also participates in the metabolic alterations characterizing ccRCC remains incompletely understood and is of particular interest, especially as this miRNA has been previously shown to target PPAR- α , the master regulator of lipid metabolism [15–17]. Furthermore, during kidney fibrosis, miR-21 overexpression contributes to fibrosis and epithelial injury by downregulating PPAR- α expression and increasing lipid accumulation [15,30–32]. In this study, based on our cohort of 52 paired ccRCC tumor tissues and matched adjacent non-tumor tissues, we showed the overexpression of miR-21 in ccRCC as well as an inverse correlation between miR-21 and PPAR- α expression. Consistent with Kim et al. [33], we also showed that the PPAR- α protein level was barely detectable in most ccRCC clinical samples, suggesting that miR-21 may influence PPAR- α expression and consequently its activity. As PPAR- α is a bona fide target of miR-21, we performed a series of experiments aiming to better characterize the regulatory mechanism shared by miR-21, PPAR- α , and lipid metabolism in ccRCC.

PPAR- α , the master regulator of lipid metabolism, typically modulates gene expression by binding to specific DNA response elements located in the promoter region of the target genes as heterodimers with retinoid X receptors (RXRs) [13]. This usually enables PPAR- α to positively regulate gene networks involved in the control of lipid metabolism, in particular the transcriptional control of genes involved in peroxymal and mitochondrial FAO, fatty acid uptake, and triglyceride catabolism. PPAR- α is also directly involved in the negative regulation of proinflammatory genes in a ligand-dependent manner by antagonizing the activities of several transcription factors such as NF- κ B and AP-1 by a less understood mechanism termed transrepression [13,34]. Here, we showed that PPAR- α negatively regulates miR-21 expression by a mechanism of transrepression involving AP-1 and NF- κ B. Indeed, our results demonstrate that PPAR- α represses miR-21 expression by decreasing AP-1 and NF- κ B transcriptional activity on the miR-21 promoter. This is consistent with previous studies that showed the overexpression and increased activity of AP-1 and NF- κ B in ccRCC [27,28], as well as their ability to increase miR-21 transcription [18,19].

Finally, we showed that silencing miR-21 is sufficient to increase PPAR- α expression and activity. To further confirm the impact of miR-21 silencing on the metabolic changes induced by PPAR- α activation, we also assessed the expression level of three transcriptional targets of PPAR- α involved in lipid metabolism: SLC22A5, the carnitine transporter; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1, which transports FA to the mitochondria and ACOX1; and acyl-CoA oxidase 1, which is the first and rate-limiting enzyme in FAO [13,14]. Of particular interest, the inhibition of miR-21 expression significantly increased the expression of these genes, suggesting that miR-21 could contribute to lipid accumulation characterizing ccRCC. A study on more than 400 renal tumor samples showed the aberrant activation of PI3K/AKT and the expression of two top proteins correlated with worse survival: reduced AMP-activated kinase (AMPK) and increased acetyl-CoA carboxylase (ACC).

Together, the downregulation of AMPK and the upregulation of ACC activity contribute to a metabolic shift towards increased FA synthesis [35]. Thus, ccRCC is characterized by a lipid storage phenotype. CPT1 is repressed by the hypoxia-inducible factor, the main signaling pathway involved in renal carcinogenesis, and reducing FAO. A lower expression of CPT1 is associated with poor patient outcomes [36]. Altering lipid metabolism may be a new therapeutic avenue for ccRCC [37–39]. In line with these studies, the miR-21-silencing strategy is of potential interest in ccRCC treatment since PTEN, a potent inhibitor of the PI3K/AKT pathway, and PPAR- α are direct targets of miR-21. Furthermore, the re-expression of PPAR- α and treatment with an agonist such as fenofibrate could increase PTEN and PDCD4 expressions and also induce FAO by increasing the expression of SLC22A5, CPT1, and ACOX1. In diabetic nephropathy, K-877, a novel PPAR- α agonist, accelerates FAO and inhibits FA synthesis by modulating the AMPK/ACC pathway [40].

Previous studies have shown that transcriptional regulation mediated by transcription factors and the post-transcriptional control exerted by miRNAs are often highly coordinated [41–43]. In particular, the interplay between miRNAs and transcriptional regulators has been shown to regulate key developmental events or cell-fate decisions [41–43]. In particular, one well-described network motif, the double-negative feedback loop, is thought to regulate many binary cell-fate decisions [42–44]. This regulatory mechanism implies that one miRNA targets a transcriptional regulator, which in turn controls the expression of this miRNA and usually acts as a switch between two alternative cell states [42–45]. In this study, we propose that, in ccRCC, miR-21 and PPAR- α function in a double-negative feedback loop, where miR-21 and PPAR- α mutually repress each other to control lipid metabolism (Figure 7). In line with this, we showed that in vitro modulation of miR-21 likely induces metabolic changes by impacting PPAR- α expression and activity.

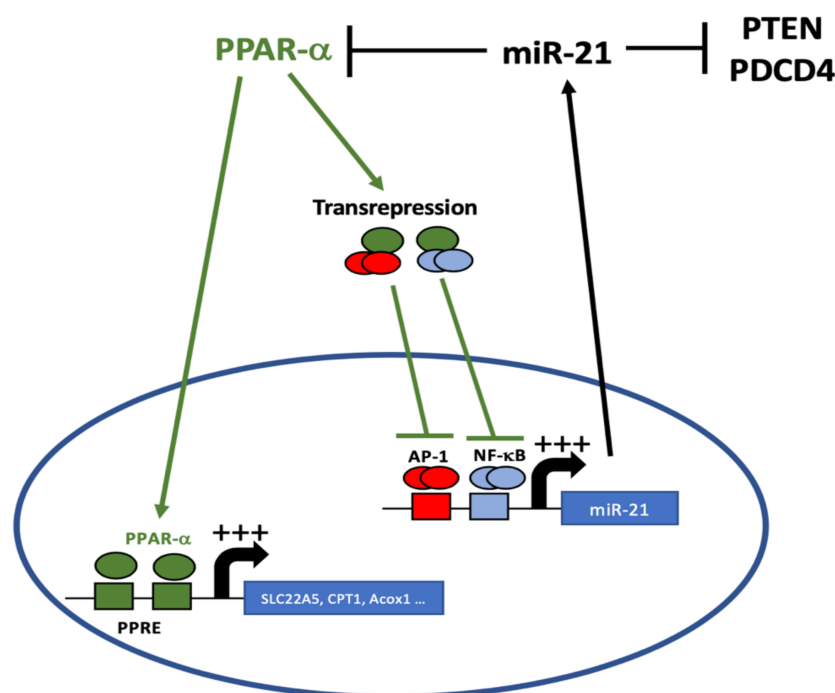


Figure 7. A double-negative feedback interaction between miR-21 and PPAR- α in clear renal cell carcinoma.

Many studies have linked miR-21 to poor prognosis and survival [29]. Previous studies have shown that the development of antisense oligonucleotides designed against miR-21 holds great promise for cancer therapy, and one anti-miR-21 drug candidate (RG-012) is already in the pipeline for clinical trials. In line with this, our data suggest that the proposed double-negative feedback interaction between PPAR- α and miR-21 could

be therapeutically exploited to restore PPAR- α expression and consequently inhibit the oncogenic events mediated by the aberrant lipid metabolism of ccRCC.

There were a few limitations in our study: (i) we did not perform in vivo experiments to support our in vitro results, and (ii) the measurement of FAO activity and lipid storage would further support the potential metabolic shift induced by miR-21 silencing and/or PPAR- α activation in ccRCC.

5. Conclusions

In this study, we propose that the lipid metabolic reprogramming of ccRCC occurs at least in part through a double-negative feedback loop between miR-21 and PPAR- α (Figure 7). miR-21 seems to be involved in the metabolic shift observed in renal cancer by targeting PPAR- α , which is one of the master regulators of lipid metabolism. In ccRCC, miR-21 silencing seems a promising strategy (i) to improve chemotherapy efficacy, (ii) to inhibit survival and anti-apoptotic pathways, and (iii) to reverse the metabolic shift toward FAO. This kind of strategy will open new therapeutic options to clinicians to ameliorate patient's care.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14030795/s1>, Figure S1: The original western blotting data.

Author Contributions: Conceptualization, M.P., N.P., S.A., V.G., and C.C.; methodology, K.G., M.G., J.W., T.S., S.F., J.-B.G., and R.L.; formal analysis, K.G., M.G., J.W., T.S., S.F., J.-B.G., I.V.S., R.L., C.C., V.G., S.A., N.P., and M.P.; writing—original draft preparation, M.G., N.P., and M.P.; writing—review and editing, I.V.S., C.C., V.G., S.A., N.P., and M.P.; supervision, C.C., V.G., S.A., N.P., and M.P.; project administration, M.P., N.P., and S.A.; funding acquisition, M.P., C.C., N.P., and S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from SIRIC ONCOLille, Grant INCa-DGOS-Inserm 6041 (S.A.); la Ligue Nationale Contre le Cancer (comité du Nord) (S.A.); the Conseil Régional du Nord Pas de Calais (M.P., C.C. and N.P.); and Région Nord-Pas-de-Calais Contrat de Plan Etat Région, CPER Cancer 2015–2020 (I.V.S.). K.G. was the recipient of a doctoral fellowship from la Ligue Nationale Contre le Cancer and Région Nord-Pas-de-Calais. M.G. and S.F. are the recipients of a doctoral fellowship from Université de Lille.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the scientific committee of the institute Tumorotheque du CHRU de Lille (approval number: CSTMT078).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank M. Samyn (Institut de Pathologie, CHRU, Lille) and M.H. Gevaert and R. Siminsky (Department d'Histologie, Faculté de Médecine, Université de Lille) for their excellent technical help. Renal cell lines RCC4 and RCC10 were a gift from D. Bernard (Inserm U1052—CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France). We also thank Tumorotheque C2R de Lille (under supervision of E. Leteurtre, Centre de Biologie-Pathologie, CHRU de Lille). pSG5-PPAR- α and J6-PPRE-TK-Luc were a gift from B. Staels (Inserm U1011, CHU de Lille, Institut Pasteur de Lille, France).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Finley, L.; Zhang, J.; Ye, J.; Ward, P.; Thompson, B. SnapShot: Cancer metabolism pathways. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 466. [CrossRef] [PubMed]
2. Hiseh, J.; Perdue, M.; Signoretti, S.; Swanton, C.; Albiges, L.; Schmidinger, M.; Heng, D.; Larkin, J.; Ficarra, V. Renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer.* **2017**, *3*, 17009. [CrossRef] [PubMed]

3. Wettersten, H.; Abu Aboud, O.; Lara, P.N., Jr.; Weiss, R. Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Nephrol.* **2017**, *13*, 410–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bi, H.; Yin, J.; Zhou, L.; Wu, Y.; Ge, L.; Lu, M.; Liu, L.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Liu, C.; et al. Clinicopathological and prognostic impact of somatic mutations in Chinese patients with clear cell renal cell carcinoma. *Transl. Androl. Urol.* **2020**, *9*, 2751–2763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kim, M.C.; Jin, Z.; Kolb, R.; Borchering, N.; Chatzkel, J.A.; Moscovita Falzarano, S.; Zhang, W. Updates on Immunotherapy and Immune Landscape in Renal Clear Cell Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 5856. [[CrossRef](#)]
6. Popławski, P.; Bogusławska, J.; Hanusek, K.; Piekietko-Witkowska, A. Nucleolar Proteins and Non-Coding RNAs: Roles in Renal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13126. [[CrossRef](#)]
7. Álvarez Ballesteros, P.; Chamorro, J.; San Román-Gil, M.; Pozas, J.; Gómez Dos Santos, V.; Ruiz Granados, A.; Grande, E.; Alonso-Gordoa, T.; Molina-Cerrillo, J. Molecular Mechanisms of Resistance to Immunotherapy and Antiangiogenic Treatments in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 5981. [[CrossRef](#)]
8. Pottier, N.; Cauffiez, C.; Perrais, M.; Barbry, P.; Mari, B. FibromiRs: Translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 119–126. [[CrossRef](#)]
9. Van der Hauwaert, C.; Glowacki, F.; Pottier, N.; Cauffiez, C. Non-Coding RNAs as New Therapeutic Targets in the Context of Renal Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1977. [[CrossRef](#)]
10. Singh, A.; Singh, A.K.; Giri, R.; Kumar, D.; Sharma, R.; Valis, M.; Kuca, K.; Garg, N. The role of microRNA-21 in the onset and progression of cancer. *Future Med. Chem.* **2021**, *13*, 1885–1906. [[CrossRef](#)]
11. Volinia, S.; Calin, G.A.; Liu, C.G.; Ambs, S.; Cimmino, A.; Petrocca, F.; Visone, R.; Iorio, M.; Roldo, C.; Ferracin, M.; et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2257–2261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gaudelot, K.; Gibier, J.B.; Pottier, N.; Hémon, B.; Van Seuning, I.; Glowacki, F.; Leroy, X.; Cauffiez, C.; Gnemmi, V.; Aubert, S.; et al. Targeting miR-21 decreases expression of multi-drug resistant genes and promotes chemosensitivity of renal carcinoma. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317707372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pawlak, M.; Lefebvre, P.; Staels, B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 720–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tahri-Joutey, M.; Andreoletti, P.; Surapureddi, S.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M.; Latruffe, N. Mechanisms Mediating the Regulation of Peroxisomal Fatty Acid Beta-Oxidation by PPAR α . *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kida, K.; Nakajima, M.; Mohri, T.; Oda, Y.; Takagi, S.; Fukami, T.; Yokoi, T. PPAR α is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2467–2476. [[CrossRef](#)]
16. Zhou, J.; Wang, K.C.; Wu, W.; Subramaniam, S.; Shyy, J.Y.; Chiu, J.J.; Li, J.Y.; Chien, S. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor- α in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10355–10360. [[CrossRef](#)]
17. Lyu, H.; Li, X.; Wu, Q.; Hao, L. Overexpression of microRNA-21 mediates Ang II-induced renal fibrosis by activating the TGF- β 1/Smad3 pathway via suppressing PPAR α . *J. Pharmacol. Sci.* **2019**, *141*, 70–78. [[CrossRef](#)]
18. Fujita, S.; Ito, T.; Mizutani, T.; Minoguchi, S.; Yamamichi, N.; Sakurai, K.; Iba, H. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J. Mol. Biol.* **2008**, *378*, 492–504. [[CrossRef](#)]
19. Mudduluru, G.; George-William, J.N.; Muppala, S.; Asangani, I.; Kumarswamy, R.; Nelson, L.D.; Allgayer, H. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci. Rep.* **2011**, *31*, 185–197. [[CrossRef](#)]
20. Bouillez, A.; Gnemmi, V.; Gaudelot, K.; Hémon, B.; Ringot, B.; Pottier, N.; Glowacki, F.; Butruille, C.; Cauffiez, C.; Hamdane, M.; et al. MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget* **2014**, *5*, 754–763. [[CrossRef](#)]
21. Gnemmi, V.; Bouillez, A.; Gaudelot, K.; Hémon, B.; Ringot, B.; Pottier, N.; Glowacki, F.; Villers, A.; Vindrieux, D.; Cauffiez, C.; et al. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ β -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett.* **2014**, *346*, 225–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vindrieux, D.; Devailly, G.; Augert, A.; Le Calvé, B.; Ferrand, M.; Pigny, P.; Payen, L.; Lambeau, G.; Perrais, M.; Aubert, S.; et al. Repression of PLA2R1 by c-MYC and HIF-2 α promotes cancer growth. *Oncotarget* **2014**, *5*, 1004–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fauquette, V.; Perrais, M.; Cerulis, S.; Jonckheere, N.; Ducourouble, M.P.; Aubert, J.P.; Pigny, P.; Van Seuning, I. The antagonistic regulation of human MUC4 and ErbB-2 genes by the Ets protein PEA3 in pancreatic cancer cells: Implications for the proliferation/differentiation balance in the cells. *Biochem. J.* **2005**, *386 Pt 1*, 35–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Perrais, M.; Chen, X.; Perez-Moreno, M.; Gumbiner, B.M. E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2013–2025. [[CrossRef](#)]
26. Aubert, S.; Fauquette, V.; Hémon, B.; Lepoivre, R.; Briez, N.; Bernard, D.; Van Seuning, I.; Leroy, X.; Perrais, M. MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 5707–5715. [[CrossRef](#)]
27. An, J.; Zhu, X.; Wang, H.; Jin, X. A dynamic interplay between alternative polyadenylation and microRNA regulation: Implications for cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 995–1001. [[CrossRef](#)]

28. Kankaya, D.; Kiremitci, S.; Tulunay, O.; Baltaci, S. Gelsolin, NF- κ B, and p53 expression in clear cell renal cell carcinoma: Impact on outcome. *Pathol. Res. Pract.* **2015**, *211*, 505–512. [[CrossRef](#)]
29. Bautista-Sánchez, D.; Arriaga-Canon, C.; Pedroza-Torres, A.; De La Rosa-Velázquez, I.A.; González-Barrios, R.; Contreras-Espinosa, L.; Montiel-Manríquez, R.; Castro-Hernández, C.; Fragoso-Ontiveros, V.; Álvarez-Gómez, R.M.; et al. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2020**, *20*, 409–420. [[CrossRef](#)]
30. Glowacki, F.; Savary, G.; Gnemmi, V.; Buob, D.; Van der Hauwaert, C.; Lo-Guidice, J.M.; Bouyé, S.; Hazzan, M.; Pottier, N.; Perrais, M.; et al. Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58014. [[CrossRef](#)]
31. Chung, K.W.; Kyeong Lee, E.; Kyung Lee, M.; Taeg Oh, G.; Pal Yu, B.; Young Chung, H. Impairment of PPAR α and the Fatty Acid Oxidation Pathway Aggravates Renal Fibrosis during Aging. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *29*, 1223–1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Su, B.; Han, H.; Ji, C.; Hu, W.; Yao, J.; Yang, J.; Fan, Y.; Li, J. MiR-21 promotes calcium oxalate-induced renal tubular cell injury by targeting PPARA. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2020**, *319*, F202–F214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kim, S.; Kim, J.M.; Lee, H.J.; Lim, J.S.; Seong, I.O.; Kim, K.H. Alteration of CYP4A11 expression in renal cell carcinoma: Diagnostic and prognostic implications. *J. Cancer* **2020**, *11*, 1478–1485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Delerive, P.; De Bosscher, K.; Besnard, S.; Vanden Berghe, W.; Peters, J.M.; Gonzalez, F.J.; Fruchart, J.C.; Tedgui, A.; Haegeman, G.; Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32048–32054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* **2013**, *499*, 43–49. [[CrossRef](#)]
36. Du, W.; Zhang, L.; Brett-Morris, A.; Aguila, B.; Kerner, J.; Hoppel, C.L.; Puchowicz, M.; Serra, D.; Herrero, L.; Rini, B.I.; et al. HIF drives lipid deposition and cancer in ccRCC via repression of fatty acid metabolism. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1769. [[CrossRef](#)]
37. Tan, S.K.; Welford, S.M. Lipid in Renal Carcinoma: Queen Bee to Target? *Trends Cancer* **2020**, *6*, 448–450. [[CrossRef](#)]
38. Lucarelli, G.; Ferro, M.; Loizzo, D.; Bianchi, C.; Terracciano, D.; Cantiglio, F.; Bell, L.N.; Battaglia, S.; Porta, C.; Gernone, A.; et al. Integration of Lipidomics and Transcriptomics Reveals Reprogramming of the Lipid Metabolism and Composition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Metabolites* **2020**, *10*, 509. [[CrossRef](#)]
39. Bobulescu, A.I.; Pop, L.M.; Mani, C.; Turner, K.; Rivera, C.; Khatoon, S.; Kairamkonda, S.; Hannan, R.; Palle, K. Renal Lipid Metabolism Abnormalities in Obesity and Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Metabolites* **2021**, *11*, 608. [[CrossRef](#)]
40. Maki, T.; Maeda, Y.; Sonoda, N.; Makimura, H.; Kimura, S.; Maeno, S.; Takayanagi, R.; Inoguchi, T. Renoprotective effect of a novel selective PPAR α modulator K-877 in db/db mice: A role of diacylglycerol-protein kinase C-NAD(P)H oxidase pathway. *Metabolism* **2017**, *71*, 33–45. [[CrossRef](#)]
41. Johnston, R.J.; Chang, S.; Etchberger, J.F.; Ortiz, C.O.; Hobert, O. MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12449–12454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sohn, E.J.; Nam, Y.K.; Park, H.T. Involvement of the miR-363-5p/P2RX4 Axis in Regulating Schwann Cell Phenotype after Nerve Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhang, W.; Yang, H.; Wang, Z.; Wu, Y.; Wang, J.; Duan, G.; Guo, Q.; Zhang, Y. miR-320a/SP1 negative reciprocal interaction contributes to cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cancer Cell Int.* **2021**, *21*, 175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sestito, R.; Cianfrocca, R.; Tocci, P.; Rosanò, L.; Sacconi, A.; Blandino, G.; Bagnato, A. Targeting endothelin 1 receptor-miR-200b/c-ZEB1 circuitry blunts metastatic progression in ovarian cancer. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhang, H.M.; Kuang, S.; Xiong, X.; Gao, T.; Liu, C.; Guo, A.Y. Transcription factor and microRNA co-regulatory loops: Important regulatory motifs in biological processes and diseases. *Brief. Bioinform.* **2015**, *16*, 45–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques :

-A-

- Abd Rashid, N., Abd Halim, S. A. S., Teoh, S. L., Budin, S. B., Hussan, F., Adib Ridzuan, N. R., & Abdul Jalil, N. A. (2021). The role of natural antioxidants in cisplatin-induced hepatotoxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 144, 112328. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112328>
- Adachi, H., Hengesbach, M., Yu, Y.-T., & Morais, P. (2021). From Antisense RNA to RNA Modification : Therapeutic Potential of RNA-Based Technologies. *Biomedicines*, 9(5), 550. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050550>
- Agata, N., Ahmad, R., Kawano, T., Raina, D., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2008). MUC1 oncoprotein blocks death receptor-mediated apoptosis by inhibiting recruitment of caspase-8. *Cancer Research*, 68(15), 6136-6144. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0464>
- Ahmad, R., Alam, M., Rajabi, H., & Kufe, D. (2012). The MUC1-C oncoprotein binds to the BH3 domain of the pro-apoptotic BAX protein and blocks BAX function. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 20866-20875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357293>
- Ahmad, R., Raina, D., Trivedi, V., Ren, J., Rajabi, H., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2007). MUC1 oncoprotein activates the IkappaB kinase beta complex and constitutive NF-kappaB signalling. *Nature Cell Biology*, 9(12), 1419-1427. <https://doi.org/10.1038/ncb1661>
- Ahmad, R., Rajabi, H., Kosugi, M., Joshi, M. D., Alam, M., Vasir, B., Kawano, T., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2011). MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop. *Science Signaling*, 4(160), ra9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001426>
- Alam, M., Bouillez, A., Tagde, A., Ahmad, R., Rajabi, H., Maeda, T., Hiraki, M., Suzuki, Y., & Kufe, D. (2016). MUC1-C Represses the Crumbs Complex Polarity Factor CRB3 and Downregulates the Hippo Pathway. *Molecular Cancer Research: MCR*, 14(12), 1266-1276. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0233>
- Alduais, Y., Zhang, H., Fan, F., Chen, J., & Chen, B. (2023). Non-small cell lung cancer (NSCLC) : A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine*, 102(8), e32899. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000032899>
- Alexander, M., Kim, S. Y., & Cheng, H. (2020). Update 2020 : Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung*, 198(6), 897-907. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00407-5>
- Alhamhoom, Y., As Sobeai, H. M., Alsanea, S., & Alhoshani, A. (2022). Aptamer-based therapy for targeting key mediators of cancer metastasis (Review). *International Journal of Oncology*, 60(6), 65. <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5355>
- Ali, R., Aouida, M., Alhaj Sulaiman, A., Madhusudan, S., & Ramotar, D. (2022). Can Cisplatin Therapy Be Improved? Pathways That Can Be Targeted. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7241. <https://doi.org/10.3390/ijms23137241>

- Andjelic, S., Hsia, C., Suzuki, H., Kadowaki, T., Koyasu, S., & Liou, H. C. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappa B/Rel are at the divergence of CD40-mediated proliferation and survival pathways. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(7), 3860-3867. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3860>
- Ando, I., Kukita, A., Soma, G., & Hino, H. (1998). A large number of tandem repeats in the polymorphic epithelial mucin gene is associated with severe acne. *The Journal of Dermatology*, 25(3), 150-152. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1998.tb02370.x>
- Apostolopoulos, V., Stojanovska, L., & Gargosky, S. E. (2015). MUC1 (CD227) : A multi-tasked molecule. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(23), 4475-4500. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2014-z>
- Atta Manu, E., Bedu-Addo, K., Titiloye, N. A., Ameh-Mensah, C., Opoku, F., & Duduyemi, B. M. (2020). Expression of Tumour-Associated MUC1 Is a Poor Prognostic Marker in Breast Cancer in Kumasi, Ghana. *Journal of Oncology*, 2020, 9752952. <https://doi.org/10.1155/2020/9752952>
- Aubert, S., Fauquette, V., Hémon, B., Lepoivre, R., Briez, N., Bernard, D., Van Seuning, I., Leroy, X., & Perrais, M. (2009). MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Research*, 69(14), 5707-5715. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4905>

-B-

- Bailey-Wilson, J. E., Sellers, T. A., Elston, R. C., Evens, C. C., & Rothschild, H. (1993). Evidence for a major gene effect in early-onset lung cancer. *The Journal of the Louisiana State Medical Society: Official Organ of the Louisiana State Medical Society*, 145(4), 157-162.
- Beatson, R., Graham, R., Grundland Freile, F., Cozzetto, D., Kannambath, S., Pfeifer, E., Woodman, N., Owen, J., Nuamah, R., Mandel, U., Pinder, S., Gillett, C., Noll, T., Bouybayoune, I., Taylor-Papadimitriou, J., & Burchell, J. M. (2020). Cancer-associated hypersialylated MUC1 drives the differentiation of human monocytes into macrophages with a pathogenic phenotype. *Communications Biology*, 3(1), 644. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01359-5>
- Behrens, M. E., Grandgenett, P. M., Bailey, J. M., Singh, P. K., Yi, C.-H., Yu, F., & Hollingsworth, M. A. (2010). The reactive tumor microenvironment : MUC1 signaling directly reprograms transcription of CTGF. *Oncogene*, 29(42), 5667-5677. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.327>
- Bitler, B. G., Goverdhan, A., & Schroeder, J. A. (2010.). MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Cell Science*. 123, 1216-23. <https://doi.org/10.1242/jcs.062661>
- Bock, F. J., & Tait, S. W. G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 85-100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
- Boolell, V., Alamgeer, M., Watkins, D. N., & Ganju, V. (2015). *The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer*. 7(3):1815-46. <https://doi.org/10.3390/cancers7030864>
- Bora-Singhal, N., Perumal, D., Nguyen, J., & Chellappan, S. (2015). Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 17(7), 538-551. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.07.001>

- Borghaei, H., Gettinger, S., Vokes, E. E., Chow, L. Q. M., Burgio, M. A., de Castro Carpeno, J., Pluzanski, A., Arrieta, O., Frontera, O. A., Chiari, R., Butts, C., Wójcik-Tomaszewska, J., Coudert, B., Garassino, M. C., Ready, N., Felip, E., García, M. A., Waterhouse, D., Domine, M., ... Brahmer, J. (2021). Five-Year Outcomes From the Randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057 : Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(7), 723-733. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01605>
- Bose, M., Sanders, A., De, C., Zhou, R., Lala, P., Schwartz, S., Mitra, B., Brouwer, C., & Mukherjee, P. (2023). Targeting tumor-associated MUC1 overcomes anoikis-resistance in pancreatic cancer. *Translational Research*, 253, 41-56. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2022.08.010>
- Bose, M., Sanders, A., Handa, A., Vora, A., Cardona, M. R., Brouwer, C., & Mukherjee, P. (2024). Molecular crosstalk between MUC1 and STAT3 influences the anti-proliferative effect of Napabucasin in epithelial cancers. *Scientific Reports*, 14(1), 3178. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53549-4>
- Bouillez, A. (2017). MUC1-C integrates PD-L1 induction with repression of immune effectors in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 36(28): 4037-4046. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.47> (a)
- Bouillez, A., Adeegbe, D., Jin, C., Hu, X., Tagde, A., Alam, M., Rajabi, H., Wong, K.-K., & Kufe, D. (2017). MUC1-C promotes the suppressive immune microenvironment in non-small cell lung cancer. *Oncolimmunology*, 6(9), e1338998. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1338998> (b)
- Bouillez, A., Gnemmi, V., Gaudelot, K., Hémon, B., Ringot, B., Pottier, N., Glowacki, F., Butruille, C., Cauffiez, C., Hamdane, M., Sergeant, N., Van Seuning, I., Leroy, X., Aubert, S., & Perrais, M. (2014). MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget*, 5(3), 754-763. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1768>
- Bouillez, A., Rajabi, H., Pitroda, S., Jin, C., Alam, M., Kharbanda, A., Tagde, A., Wong, K.-K., & Kufe, D. (2016). Inhibition of MUC1-C Suppresses MYC Expression and Attenuates Malignant Growth in KRAS Mutant Lung Adenocarcinomas. *Cancer Research*, 76(6), 1538-1548. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1804>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Buyuk, M., Ozluk, Y., Bakkaloglu, D. V., Ozkan, B., Firat, P., & Yilmazbayhan, D. (2023). Evaluation of MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 Expression Differences in Lung Adenocarcinoma Subtypes by Using a Final Immunoreactivity Score (FIRS). *Turk Patoloji Dergisi*, 39(1), 64-74. <https://doi.org/10.5146/tjpath.2022.01593>

-C-

- Cai, H., Chen, M.-S., Sun, Z.-Y., Zhao, Y.-F., Kunz, H., & Li, Y.-M. (2013). Self-adjuvanting synthetic antitumor vaccines from MUC1 glycopeptides conjugated to T-cell epitopes from tetanus toxoid. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 52(23), 6106-6110. <https://doi.org/10.1002/anie.201300390>
- Cascio, S., & Finn, O. J. (2016). Intra- and Extra-Cellular Events Related to Altered Glycosylation of MUC1 Promote Chronic Inflammation, Tumor Progression, Invasion, and Metastasis. *Biomolecules*, 6(4), 39. <https://doi.org/10.3390/biom6040039>

- Cascio, S., Zhang, L., & Finn, O. J. (2011). MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor- κ B p65 and binding to cytokine promoters : Importance of extracellular domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42248-42256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.297630>
- Chaika, N. V., Gebregiworgis, T., Lewallen, M. E., Purohit, V., Radhakrishnan, P., Liu, X., Zhang, B., Mehla, K., Brown, R. B., Caffrey, T., Yu, F., Johnson, K. R., Powers, R., Hollingsworth, M. A., & Singh, P. K. (2012). MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia-inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13787-13792. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203339109>
- Chan, A. K., Lockhart, D. C., von Bernstorff, W., Spanjaard, R. A., Joo, H. G., Eberlein, T. J., & Goedegebuure, P. S. (1999). Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. *International Journal of Cancer*, 82(5), 721-726. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990827\)82:5<721::aid-ijc16>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990827)82:5<721::aid-ijc16>3.0.co;2-n)
- Chan, B. A., & Hughes, B. G. M. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer : Current standards and the promise of the future. *Translational Lung Cancer Research*, 4(1):36-54. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.05.01>
- Chen, Q., Li, D., Ren, J., Li, C., & Xiao, Z.-X. (2013). MUC1 activates JNK1 and inhibits apoptosis under genotoxic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(1), 179-183. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.055>
- Chen, W., Zhang, Z., Zhang, S., Zhu, P., Ko, J. K.-S., & Yung, K. K.-L. (2021). MUC1 : Structure, Function, and Clinic Application in Epithelial Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 18;22(12):6567. <https://doi.org/10.3390/ijms22126567>
- Ciarimboli, G. (2012). Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Effects and Side Effects. *Scientifica*, 2012, 1-18. <https://doi.org/10.6064/2012/473829>
- Circu, M., Cardelli, J., Barr, M. P., O'Byrne, K., Mills, G., & El-Osta, H. (2017). Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells. *PloS One*, 12(9), e0184922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184922>
- D-
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy : Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dauchy, S., Tournier, N., Yousif, S., Jacob, A., & Decleves, X. (2008). Barrière hémato-encéphalique : Implication des transporteurs ABC en neuropharmacologie. *Réanimation*, 17(7), 664-669. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2008.07.013>
- de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W., & Munden, R. F. (2018). The epidemiology of lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 7(3), 220-233. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.06>
- DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643-8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>

- Dewaeles, E., Carvalho, K., Fellah, S., Sim, J., Boukrout, N., Caillierez, R., Ramakrishnan, H., Van der Hauwaert, C., Vijaya Shankara, J., Martin, N., Massri, N., Launay, A., Folger, J. K., de Schutter, C., Larrue, R., Loison, I., Goujon, M., Jung, M., Le Gras, S., ... Cauffiez, C. (2022). Istradefylline protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin antitumor effects. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(22), e152924. <https://doi.org/10.1172/JCI152924>
- Dhanisha, S. S., Guruvayoorappan, C., Drishya, S., & Abeesh, P. (2018). Mucins : Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 122, 98-122. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.12.006>
- Doll, R., & Hill, A. B. (1950). Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *British Medical Journal*, 2(4682), 739-748. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4682.739>
- Duan, M., Ulibarri, J., Liu, K. J., & Mao, P. (2020). Role of Nucleotide Excision Repair in Cisplatin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9248. <https://doi.org/10.3390/ijms21239248>
- Duma, N., Santana-Davila, R., and Molina, J. (2019). Non-Small Cell Lung Cancer : Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *MAYO CLINIC PROCEEDINGS*. 94(8):1623-640. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>
- Dvela-Levitt, M., Kost-Alimova, M., Emani, M., Kohnert, E., Thompson, R., Sidhom, E.-H., Rivadeneira, A., Sahakian, N., Rognot, J., Papagregoriou, G., Montesinos, M. S., Clark, A. R., McKinney, D., Gutierrez, J., Roth, M., Ronco, L., Elonga, E., Carter, T. A., Gnirke, A., ... Greka, A. (2019). Small Molecule Targets TMED9 and Promotes Lysosomal Degradation to Reverse Proteinopathy. *Cell*, 178(3), 521-535.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.002>
- E-
- Eguchi, T., Kadota, K., Park, B. J., Travis, W. D., Jones, D. R., & Adusumilli, P. S. (2014). The new IASLC-ATS-ERS lung adenocarcinoma classification : What the surgeon should know. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 26(3), 210-222. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2014.09.002>
- F-
- Fennell, D. A., Summers, Y., Cadranet, J., Benepal, T., Christoph, D. C., Lal, R., Das, M., Maxwell, F., Visseren-Grul, C., & Ferry, D. (2016). Cisplatin in the modern era : The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 44, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.01.003>
- Ferreira, C. S. M., Matthews, C. S., & Missailidis, S. (2006). DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker : Design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 27(6), 289-301. <https://doi.org/10.1159/000096085>
- Fiedler, W., DeDosso, S., Cresta, S., Weidmann, J., Tessari, A., Salzberg, M., Dietrich, B., Baumeister, H., Goletz, S., Gianni, L., & Sessa, C. (2016). A phase I study of PankoMab-GEX, a humanised glyco-optimised monoclonal antibody to a novel tumour-specific MUC1 glycopeptide epitope in patients with advanced carcinomas. *European Journal of Cancer*, 63, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.05.003>

- Gaemers, I. C., Vos, H. L., Volders, H. H., van der Valk, S. W., & Hilkens, J. (2001). A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6191-6199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009449200>
- Gálffy, G., Morócz, É., Korompay, R., Hécz, R., Bujdosó, R., Puskás, R., Lovas, T., Gáspár, E., Yahya, K., Király, P., & Lohinai, Z. (2024). Targeted therapeutic options in early and metastatic NSCLC-overview. *Pathology Oncology Research: POR*, 30, 1611715. <https://doi.org/10.3389/pore.2024.1611715>
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869-1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>
- Gandhi, L., Rodríguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M. J., Powell, S. F., Cheng, S. Y.-S., Bischoff, H. G., Peled, N., Grossi, F., Jennens, R. R., Reck, M., Hui, R., Garon, E. B., Boyer, M., ... KEYNOTE-189 Investigators. (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 378(22), 2078-2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>
- Gao, J., McConnell, M. J., Yu, B., Li, J., Balko, J. M., Black, E. P., Johnson, J. O., Lloyd, M. C., Altioik, S., & Haura, E. B. (2009). MUC1 is a downstream target of STAT3 and regulates lung cancer cell survival and invasion. *International Journal of Oncology*, 35(2), 337-345. <https://doi.org/10.3892/ijo.00000345>
- Ge, C., Li, R., Song, H., Geng, T., Yang, J., Tan, Q., Song, L., Wang, Y., Xue, Y., Li, Z., Dong, S., Zhang, Z., Zhang, N., Guo, J., Hua, L., Chen, S., & Song, X. (2017). Phase I clinical trial of a novel autologous modified-DC vaccine in patients with resected NSCLC. *BMC Cancer*, 17(1), 884. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3859-3>
- Gebregiworgis, T., Purohit, V., Shukla, S. K., Tadros, S., Chaika, N. V., Abrego, J., Mulder, S. E., Gunda, V., Singh, P. K., & Powers, R. (2017). Glucose Limitation Alters Glutamine Metabolism in MUC1-Overexpressing Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Proteome Research*, 16(10), 3536-3546. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00246>
- Gendler, S. J. (2001). MUC1, the renaissance molecule. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6(3), 339-353. <https://doi.org/10.1023/a:1011379725811>
- Gendler, S. J., Burchell, J. M., Duhig, T., Lampert, D., White, R., Parker, M., & Taylor-Papadimitriou, J. (1987). Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(17), 6060-6064. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.17.6060>
- Gendler, S. J., & Spicer, A. P. (1995). Epithelial mucin genes. *Annual Review of Physiology*, 57, 607-634. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003135>
- Gnemmi, V., Bouillez, A., Gaudelot, K., Hémon, B., Ringot, B., Pottier, N., Glowacki, F., Villers, A., Vindrieux, D., Cauffiez, C., Van Seuning, I., Bernard, D., Leroy, X., Aubert, S., & Perrais, M. (2014). MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ β -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Letters*, 346(2), 225-236. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.029>

Goldstraw, P., Ball, D., Jett, J. R., Le Chevalier, T., Lim, E., Nicholson, A. G., & Shepherd, F. A. (2011). Non-small-cell lung cancer. *The Lancet*, 378(9804), 1727-1740. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62101-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62101-0)

Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer : The roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), 1295-1322. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4414>

-H-

Ham, S., Kwon, T., Bak, Y., Yu, J.-H., Hong, J., Lee, S.K., Yu, D.-Y., Yoon, D.-Y. (2016). *Mucin 1-mediated chemoresistance in lung cancer cells*. 18;5(1):e185. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.47>

Han, J.-Y., Hong, E. K., Choi, B. G., Park, J. N., Kim, K. W., Kang, J. H., Jin, J.-Y., Park, S. Y., Hong, Y. S., & Lee, K. S. (2003). Death receptor 5 and Bcl-2 protein expression as predictors of tumor response to gemcitabine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 20(4), 355-362. <https://doi.org/10.1385/MO:20:4:355>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer : New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanisch, F.-G., & Muller, S. (2000). MUC1 : The polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*, 10(5), 439-449. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.5.439>

Haratake, N., Ozawa, H., Morimoto, Y., Yamashita, N., Daimon, T., Bhattacharya, A., Wang, K., Nakashoji, A., Isozaki, H., Shimokawa, M., Kikutake, C., Suyama, M., Hashinokuchi, A., Takada, K., Takenaka, T., Yoshizumi, T., Mitsudomi, T., Hata, A. N., & Kufe, D. (2024). MUC1-C Is a Common Driver of Acquired Osimertinib Resistance in NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 19(3), 434-450. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2023.10.017>

Hasegawa, M., Sinha, R. K., Kumar, M., Alam, M., Yin, L., Raina, D., Kharbanda, A., Panchamoorthy, G., Gupta, D., Singh, H., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2015). Intracellular Targeting of the Oncogenic MUC1-C Protein with a Novel GO-203 Nanoparticle Formulation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(10), 2338-2347. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3000>

Hashash, J. G., Beatty, P. L., Critelli, K., Hartman, D. J., Regueiro, M., Tamim, H., Regueiro, M. D., Binion, D. G., & Finn, O. J. (2021). Altered Expression of the Epithelial Mucin MUC1 Accompanies Endoscopic Recurrence of Postoperative Crohn's Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 55(2), 127-133. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001340>

Hatstrup, C. L., & Gendler, S. J. (2006). MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research: BCR*, 8(4), R37. <https://doi.org/10.1186/bcr1515>

Hatstrup, C. L., & Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology*, 70, 431-457. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659>

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3), 344-362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>

- He, Y., Jiang, X., Duan, L., Xiong, Q., Yuan, Y., Liu, P., Jiang, L., Shen, Q., Zhao, S., Yang, C., & Chen, Y. (2021). LncRNA PKMYT1AR promotes cancer stem cell maintenance in non-small cell lung cancer via activating Wnt signaling pathway. *Molecular Cancer*, 20(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01469-6>
- Hellberg, V., Wallin, I., Eriksson, S., Hernlund, E., Jerremalm, E., Berndtsson, M., Eksborg, S., Arnér, E. S. J., Shoshan, M., Ehrsson, H., & Laurell, G. (2009). Cisplatin and oxaliplatin toxicity : Importance of cochlear kinetics as a determinant for ototoxicity. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(1), 37-47. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn418>
- Hellmann, M. D., Rizvi, N. A., Goldman, J. W., Gettinger, S. N., Borghaei, H., Brahmer, J. R., Ready, N. E., Gerber, D. E., Chow, L. Q., Juergens, R. A., Shepherd, F. A., Laurie, S. A., Geese, W. J., Agrawal, S., Young, T. C., Li, X., & Antonia, S. J. (2017). Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012) : Results of an open-label, phase 1, multicohort study. *The Lancet. Oncology*, 18(1), 31-41. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30624-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30624-6)
- Hilkens, J., Ligtenberg, M. J., Vos, H. L., & Litvinov, S. V. (1992). Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(9), 359-363. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90315-z](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90315-z)
- Hollingsworth, M. A., & Swanson, B. J. (2004). Mucins in cancer : Protection and control of the cell surface. *Nature Reviews. Cancer*, 4(1), 45-60. <https://doi.org/10.1038/nrc1251>
- Holzer, A. K., & Howell, S. B. (2006). The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Research*, 66(22), 10944-10952. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1710>
- Hostetter, A. A., Osborn, M. F., & DeRose, V. J. (2012). RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Chemical Biology*, 7(1), 218-225. <https://doi.org/10.1021/cb200279p>
- Hu, L.-Y., Mi, W.-L., Wu, G.-C., Wang, Y.-Q., & Mao-Ying, Q.-L. (2019). Prevention and Treatment for Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy : Therapies Based on CIPN Mechanisms. *Current Neuropharmacology*, 17(2), 184-196. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170915143217>
- Hu, Y., Duan, J., Zhan, Q., Wang, F., Lu, X., & Yang, X.-D. (2012). Novel MUC1 aptamer selectively delivers cytotoxic agent to cancer cells in vitro. *PLoS One*, 7(2), e31970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031970>
- Huang, D., Savage, S. R., Calinawan, A. P., Lin, C., Zhang, B., Wang, P., Starr, T. K., Birrer, M. J., & Paulovich, A. G. (2021). A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene*, 40(46), 6395-6405. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02055-2>
- Huang, G., Zhang, Q., Xu, C., Chen, L., & Zhang, H. (2022). Mechanism of kidney injury induced by cisplatin. *Toxicology Research*, 11(3), 385-390. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfac019>
- Huang, L., Chen, D., Liu, D., Yin, L., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2005). MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3 β -mediated phosphorylation and degradation of β -catenin. *Cancer Research*, 65(22), 10413-10422. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2474>

- Huang, L., Ren, J., Chen, D., Li, Y., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2003). MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biology & Therapy*, 2(6), 702-706.
- Huang, T., Song, X., Xu, D., Tiek, D., Goenka, A., Wu, B., Sastry, N., Hu, B., & Cheng, S.-Y. (2020). Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics*, 10(19), 8721-8743. <https://doi.org/10.7150/thno.41648>
- Huang, W.-C., Chan, M.-L., Chen, M.-J., Tsai, T.-H., & Chen, Y.-J. (2016). *Modulation of macrophage polarization and lung cancer cell stemness by MUC1 and development of a related small-molecule inhibitor pterostilbene*. 28;7(26):39363-39375. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8101>
- Huang, X., Sun, Q., Chen, C., Zhang, Y., Kang, X., Zhang, J.-Y., Ma, W., Xia, L., Xu, L., Xu, X.-Y., & Ren, B.-H. (2017). *MUC1 overexpression predicts worse survival in patients with non-small cell lung cancer : Evidence from an updated meta- analysis*. 3;8(52):90315-90326. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19861>

-J-

- Jiang, Z.-B., Huang, J.-M., ... , Leung, E. (2020). Evodiamine suppresses non-small cell lung cancer by elevating CD8+ T cells and downregulating the MUC1-C/PD-L1 axis. *Clinical Cancer Research*. 19;39(1):249. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01741-5>
- Jin, W., Liao, X., Lv, Y., Pang, Z., Wang, Y., Li, Q., Liao, Y., Ye, Q., Chen, G., Zhao, K., & Huang, L. (2017). MUC1 induces acquired chemoresistance by upregulating ABCB1 in EGFR-dependent manner. *Cell Death & Disease*, 8(8), e2980. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.378>
- Jin, W., Zhang, M., Dong, C., Huang, L., & Luo, Q. (2022). The multifaceted role of MUC1 in tumor therapy resistance. *Clinical and Experimental Medicine*, 23(5), 1441-1474. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00978-y>
- Jonckheere, N., Skrypek, N., & Seuningen, I. V. (2014). Mucins and tumor resistance to chemotherapeutic drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1846(1):142-51. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.008>
- Jonckheere, N., & Van Seuningen, I. (2010). The membrane-bound mucins : From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*, 92(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.09.018>

-K-

- Kamal, N. S., Soria, J.-C., Mendiboure, J., Planchard, D., Olaussen, K. A., Rousseau, V., Popper, H., Pirker, R., Bertrand, P., Dunant, A., Le Chevalier, T., Filipits, M., Fouret, P., & International Adjuvant Lung Trial-Bio investigators. (2010). MutS homologue 2 and the long-term benefit of adjuvant chemotherapy in lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(4), 1206-1215. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2204>
- Karar, J., & Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, 51. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00051>
- Karczmarek-Borowska, B., Filip, A., Wojcierowski, J., Smoleń, A., Pilecka, I., & Jabłonna, A. (2005). Survivin antiapoptotic gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer : In situ hybridization study. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 43(4), 237-242.

- Kasprzak, A., & Adamek, A. (2019). Mucins : The Old, the New and the Promising Factors in Hepatobiliary Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1288. <https://doi.org/10.3390/ijms20061288>
- Kato, T., Ujiie, H., Hatanaka, K. C., Nange, A., Okumura, A., Tsubame, K., Naruchi, K., Sato, M., Kaga, K., Matsuno, Y., Wakasa, S., & Hatanaka, Y. (2021). A novel Tn antigen epitope-recognizing antibody for MUC1 predicts clinical outcome in patients with primary lung adenocarcinoma. *Oncology Letters*, 21(3), 202. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12463>
- Kharbanda, A., Rajabi, H., Jin, C., Alam, M., Wong, K.-K., & Kufe, D. (2014). MUC1-C confers EMT and KRAS independence in mutant KRAS lung cancer cells. *Oncotarget*, 5(19), 8893-8905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2360>
- Kharbanda, A., Rajabi, H., Jin, C., Tchaicha, J., Kikuchi, E., Wong, K.-K., & Kufe, D. (2014). Targeting the oncogenic MUC1-C protein inhibits mutant EGFR-mediated signaling and survival in non-small cell lung cancer cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(21), 5423-5434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3168>
- Khodabakhsh, F., Merikhian, P., Eisavand, M. R., & Farahmand, L. (2021). Crosstalk between MUC1 and VEGF in angiogenesis and metastasis : A review highlighting roles of the MUC1 with an emphasis on metastatic and angiogenic signaling. *Cancer Cell International*, 21(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01899-8>
- Kilari, D., Guancial, E., & Kim, E. S. (2016). Role of copper transporters in platinum resistance. *World Journal of Clinical Oncology*, 7(1), 106-113. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.106>
- Koh, H., Park, H., Chandimali, N., Huynh, D. L., Zhang, J. J., Ghosh, M., Gera, M., Kim, N., Bak, Y., Yoon, D.-Y., Park, Y. H., Kwon, T., & Jeong, D. K. (2017). MicroRNA-128 suppresses paclitaxel-resistant lung cancer by inhibiting MUC1-C and BMI-1 in cancer stem cells. *Oncotarget*, 8(66), 110540-110551. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22818>
- Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Baas, F., & Borst, P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Research*, 57(16), 3537-3547.
- Kosugi, M., Ahmad, R., Alam, M., Uchida, Y., & Kufe, D. (2011). MUC1-C oncoprotein regulates glycolysis and pyruvate kinase M2 activity in cancer cells. *PloS One*, 6(11), e28234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028234>
- Kovarik, A., Lu, P. J., Peat, N., Morris, J., & Taylor-Papadimitriou, J. (1996). Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 18140-18147. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.18140>
- Kramps, T., & Elbers, K. (2017). Introduction to RNA Vaccines. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1499, 1-11. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6481-9_1
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99-163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>

- Kryczka, J., Kryczka, J., Czarnecka-Chrebelska, K. H., & Brzezińska-Lasota, E. (2021). Molecular Mechanisms of Chemoresistance Induced by Cisplatin in NSCLC Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8885. <https://doi.org/10.3390/ijms22168885>
- Kufe, D. W. (2020). *MUC1-C in chronic inflammation and carcinogenesis; emergence as a target for cancer treatment*. *Carcinogenesis*, 24;41(9):1173-1183. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa082>
- Kufe, D. W. (2009). Mucins in cancer : Function, prognosis and therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 9(12), 874-885. <https://doi.org/10.1038/nrc2761>
- Kufe, D. W. (2013). *MUC1-C Oncoprotein as a Target in Breast Cancer; Activation of Signaling Pathways and Therapeutic Approaches*. *Oncogene*, 28;32(9):1073-81. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.158>
- Kufe, D. W. (2022). Emergence of MUC1 in Mammals for Adaptation of Barrier Epithelia. *Cancers*, 14(19), 4805. <https://doi.org/10.3390/cancers14194805>
- Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., & Erdmann, V. A. (2002). Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 1911-1918. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.1911>

-L-

- Lagow, E. L., & Carson, D. D. (2002). Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Cellular Biochemistry*, 86(4), 759-772. <https://doi.org/10.1002/jcb.10261>
- Lampe, H., Tam, L., & Hansen, A. R. (2024). Bi-specific T-cell engagers (BiTEs) in prostate cancer and strategies to enhance development : Hope for a BiTE-r future. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1399802. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1399802>
- Lappi-Blanco, E., Mäkinen, J. M., Lehtonen, S., Karvonen, H., Sormunen, R., Laitakari, K., Johnson, S., Mäkitaro, R., Bloigu, R., & Kaarteenaho, R. (2016). Mucin-1 correlates with survival, smoking status, and growth patterns in lung adenocarcinoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 13811-13820. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5269-6>
- Ledermann, J. A., Zurawski, B., Raspagliesi, F., De Giorgi, U., Arranz Arijia, J., Romeo Marin, M., Lisyanskaya, A., Póka, R. L., Markowska, J., Cebotaru, C., Casado Herraiez, A., Colombo, N., Kutarska, E., Hall, M., Jacobs, A., Ahrens-Fath, I., Baumeister, H., Zurlo, A., & Sehouli, J. (2022). Maintenance therapy of patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma with the anti-tumor-associated-mucin-1 antibody gatipotuzumab : Results from a double-blind, placebo-controlled, randomized, phase II study. *ESMO Open*, 7(1), 100311. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100311>
- Lee, D., Baek, S., Kim, Y.-Y., Bang, Y., Jung, H. N., Im, H.-J., & Song, Y.-K. (2022). Self-Assembled DNA-Protein Hybrid Nanospheres : Biocompatible Nano-Drug-Carriers for Targeted Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(33), 37493-37503. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c10397>
- Lee, D.-H., Choi, S., Park, Y., & Jin, H. (2021). Mucin1 and Mucin16 : Therapeutic Targets for Cancer Therapy. *Pharmaceuticals*, 14(10), 1053. <https://doi.org/10.3390/ph14101053>

- Leech, S. H., Olie, R. A., Gautschi, O., Simões-Wüst, A. P., Tschopp, S., Häner, R., Hall, J., Stahel, R. A., & Zangemeister-Wittke, U. (2000). Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment. *International Journal of Cancer*, 86(4), 570-576. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(20000515\)86:4<570::aid-ijc20>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(20000515)86:4<570::aid-ijc20>3.0.co;2-t)
- Levina, V., Marrangoni, A. M., DeMarco, R., Gorelik, E., & Lokshin, A. E. (2008). Drug-selected human lung cancer stem cells : Cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PloS One*, 3(8), e3077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003077>
- Li, Y., Yi, H., Yao, Y., Liao, X., Xie, Y., Yang, J., Yan, Z., Wang, L., Lu, S., Kuang, Y., Gu, M., Fei, J., Wang, Z., & Huang, L. (2011). The cytoplasmic domain of MUC1 induces hyperplasia in the mammary gland and correlates with nuclear accumulation of β -catenin. *PloS One*, 6(4), e19102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019102>
- Lin, X., Chen, H., Xie, Y., Zhou, X., Wang, Y., Zhou, J., Long, S., Hu, Z., Zhang, S., Qiu, W., Zeng, Z., & Liu, L. (2022). Combination of CTLA-4 blockade with MUC1 mRNA nanovaccine induces enhanced anti-tumor CTL activity by modulating tumor microenvironment of triple negative breast cancer. *Translational Oncology*, 15(1), 101298. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101298>
- Lin, X., Guan, T., Li, Y., Lin, Y., Huang, G., Lin, Y., Sun, P., Li, C., Gu, J., Zeng, H., & Ma, C. (2024). Efficacy of MUC1-targeted CAR-NK cells against human tongue squamous cell carcinoma. *Frontiers in Immunology*, 15, 1337557. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1337557>
- Liu, L., Wang, Y., Miao, L., Liu, Q., Musetti, S., Li, J., & Huang, L. (2018). Combination Immunotherapy of MUC1 mRNA Nano-vaccine and CTLA-4 Blockade Effectively Inhibits Growth of Triple Negative Breast Cancer. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(1), 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.10.020>
- Lopez-Ayllon, B. D., Moncho-Amor, V., Abarrategi, A., Ibañez de Cáceres, I., Castro-Carpeño, J., Belda-Iniesta, C., Perona, R., & Sastre, L. (2014). Cancer stem cells and cisplatin-resistant cells isolated from non-small-lung cancer cell lines constitute related cell populations. *Cancer Medicine*, 3(5), 1099-1111. <https://doi.org/10.1002/cam4.291>
- Lu, Y., & Cederbaum, A. I. (2006). Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 89(2), 515-523. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj031>
- Lu, Y., Liu, Y., Oeck, S., Zhang, G. J., Schramm, A., & Glazer, P. M. (2020). Hypoxia Induces Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer Cells via Upregulation of FGFR1 and the MAPK Pathway. *Cancer Research*, 80(21), 4655-4667. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1192>
- Lucarelli, G., Rutigliano, M., Loizzo, D., di Meo, N. A., Lasorsa, F., Mastropasqua, M., Maiorano, E., Bizzoca, C., Vincenti, L., Battaglia, M., & Ditunno, P. (2022). MUC1 Tissue Expression and Its Soluble Form CA15-3 Identify a Clear Cell Renal Cell Carcinoma with Distinct Metabolic Profile and Poor Clinical Outcome. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13968. <https://doi.org/10.3390/ijms232213968>
- Lugones, Y., Loren, P., & Salazar, L. A. (2022). Cisplatin Resistance : Genetic and Epigenetic Factors Involved. *Biomolecules*, 12(10), 1365. <https://doi.org/10.3390/biom12101365>

- Madan, E., Gogna, R., Bhatt, M., Pati, U., Kuppusamy, P., & Mahdi, A. A. (2011). Regulation of glucose metabolism by p53 : Emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget*, 2(12), 948-957. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.389>
- Maeda, T., Hiraki, M., Jin, C., Rajabi, H., Tagde, A., Alam, M., Bouillez, A., Hu, X., Suzuki, Y., Miyo, M., Hata, T., Hinohara, K., & Kufe, D. (2018). MUC1-C Induces PD-L1 and Immune Evasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*, 78(1), 205-215. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1636>
- Makovec, T. (2019). Cisplatin and beyond : Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology*, 53(2), 148-158. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European Respiratory Journal*, 48(3), 889-902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
- Malmberg, E. K., Pelaseyed, T., Petersson, A. C., Seidler, U. E., De Jonge, H., Riordan, J. R., & Hansson, G. C. (2008). The C-terminus of the transmembrane mucin MUC17 binds to the scaffold protein PDZK1 that stably localizes it to the enterocyte apical membrane in the small intestine. *The Biochemical Journal*, 410(2), 283-289. <https://doi.org/10.1042/BJ20071068>
- Mandic, A., Hansson, J., Linder, S., & Shoshan, M. C. (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9100-9106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210284200>
- Martín-Sánchez, J. C., Lunet, N., González-Marrón, A., Lidón-Moyano, C., Matilla-Santander, N., Clèries, R., Malvezzi, M., Negri, E., Morais, S., Costa, A. R., Ferro, A., Lopes-Conceição, L., La Vecchia, C., & Martínez-Sánchez, J. M. (2018). Projections in Breast and Lung Cancer Mortality among Women : A Bayesian Analysis of 52 Countries Worldwide. *Cancer Research*, 78(15), 4436-4442. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0187>
- Mehla, K., & Singh, P. K. (2014). MUC1 : A novel metabolic master regulator. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1845(2), 126-135. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.01.001>
- Mei, Z., Zhang, K., Lam, A. K.-Y., Huang, J., Qiu, F., Qiao, B., & Zhang, Y. (2020). MUC1 as a target for CAR-T therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine*, 9(2), 640-652. <https://doi.org/10.1002/cam4.2733>
- Meijer, J.-J., Leonetti, A., Airò, G., Tiseo, M., Rolfo, C., Giovannetti, E., & Vahabi, M. (2022). Small cell lung cancer : Novel treatments beyond immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 376-385. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2022.05.004>
- Memon, D., Schoenfeld, A. J., Ye, D., Fromm, G., Rizvi, H., Zhang, X., Keddar, M. R., Mathew, D., Yoo, K. J., Qiu, J., Lihm, J., Miriyala, J., Sauter, J. L., Luo, J., Chow, A., Bhanot, U. K., McCarthy, C., Vanderbilt, C. M., Liu, C., ... Hellmann, M. D. (2024). Clinical and molecular features of acquired resistance to immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell*, 42(2), 209-224.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.12.013>

- Merlin, J., Stechly, L., de Beaucé, S., Monté, D., Leteurtre, E., van Seuning, I., Huet, G., & Pigny, P. (2011). Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 30(22), 2514-2525. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.631>
- Milara, J., Ballester, B., Montero, P., Escriva, J., Artigues, E., Alós, M., Pastor-Clerigues, A., Morcillo, E., & Cortijo, J. (2020). MUC1 intracellular bioactivation mediates lung fibrosis. *Thorax*, 75(2), 132-142. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-212735>
- Missailidis, S., Thomaidou, D., Borbas, K. E., & Price, M. R. (2005). Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting. *Journal of Immunological Methods*, 296(1-2), 45-62. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.10.011>
- Mittal, V. (2018). Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annual Review of Pathology*, 13, 395-412. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043854>
- Miyazaki, K., Kishimoto, H., Kobayashi, H., Suzuki, A., Higuchi, K., Shirasaka, Y., & Inoue, K. (2023). The Glycosylated N-Terminal Domain of MUC1 Is Involved in Chemoresistance by Modulating Drug Permeation Across the Plasma Membrane. *Molecular Pharmacology*, 103(3), 166-175. <https://doi.org/10.1124/molpharm.122.000597>
- Moniaux, N., Escande, F., Porchet, N., Aubert, J.-P., & Batra, S. K. (2001). *STRUCTURAL ORGANIZATION AND CLASSIFICATION OF THE HUMAN MUCIN GENES*. *Frontier in Bioscience*. 1:6:D1192-206. <https://doi.org/10.2741/moniaux>
- Morimoto, Y., Yamashita, N., Daimon, T., Hirose, H., Yamano, S., Haratake, N., Ishikawa, S., Bhattacharya, A., Fushimi, A., Ahmad, R., Takahashi, H., Dashevsky, O., Mitsiades, C., & Kufe, D. (2023). MUC1-C is a master regulator of MICA/B NKG2D ligand and exosome secretion in human cancer cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 11(2), e006238. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-006238>
- Mukhtar, E., Adhami, V. M., & Mukhtar, H. (2014). Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(2), 275-284. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0791>

-N-

- Nabavinia, M. S., Gholoobi, A., Charbgo, F., Nabavinia, M., Ramezani, M., & Abnous, K. (2017). Anti-MUC1 aptamer : A potential opportunity for cancer treatment. *Medicinal Research Reviews*, 37(6), 1518-1539. <https://doi.org/10.1002/med.21462>
- Nagasaka, M., & Gadgeel, S. M. (2018). Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(1), 63-70. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1409624>
- Nath, S., Daneshvar, K., Roy, L.D., Grover, P., Kidiyoor, A., Mosley, L., Sahraei, M., Mukherjee, P. (2013). *MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes*. *Oncogenesis*. 17;2(6):e51. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.16>
- Nath, S., & Mukherjee, P. (2014). MUC1 : A multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine*, 20(6), 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.02.007>
- Nelson, W. J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 2), 149-155. <https://doi.org/10.1042/BST0360149>

Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8661. <https://doi.org/10.3390/ijms22168661>

-O-

Olaussen, K. A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., André, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J.-P., Tursz, T., Le Chevalier, T., Soria, J.-C., & IALT Bio Investigators. (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 355(10), 983-991. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa060570>

-P-

Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., & Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11, 583084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>

Pan, Z., Zhang, H., & Dokudovskaya, S. (2023). The Role of mTORC1 Pathway and Autophagy in Resistance to Platinum-Based Chemotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10651. <https://doi.org/10.3390/ijms241310651>

Panchamoorthy, G., Jin, C., Raina, D., Bharti, A., Yamamoto, M., Adeebge, D., Zhao, Q., Bronson, R., Jiang, S., Li, L., Suzuki, Y., Tagde, A., Ghoroghchian, P. P., Wong, K.-K., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2018). Targeting the human MUC1-C oncoprotein with an antibody-drug conjugate. *JCI Insight*, 3(12), e99880, 99880. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99880>

Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy : Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460-473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>

Paz-Ares, L., Luft, A., Vicente, D., Tafreshi, A., Gümüş, M., Mazières, J., Hermes, B., Çay Şenler, F., Csősz, T., Fülöp, A., Rodríguez-Cid, J., Wilson, J., Sugawara, S., Kato, T., Lee, K. H., Cheng, Y., Novello, S., Halmos, B., Li, X., ... KEYNOTE-407 Investigators. (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(21), 2040-2051. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1810865>

Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Salamon, I., & Bukovac, A. (2020). Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 122. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00122>

Pemberton, L. F., Rughetti, A., Taylor-Papadimitriou, J., & Gendler, S. J. (1996). The epithelial mucin MUC1 contains at least two discrete signals specifying membrane localization in cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2332-2340. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.4.2332>

Petrović, M., & Todorović, D. (2016). BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF CISPLATIN IN CANCER CELLS. <https://www.semanticscholar.org/paper/BIOCHEMICAL-AND-MOLECULAR-MECHANISMS-OF-ACTION-OF-Petrovic-Todorovic/81413e2d79c305d30ec3c9e085f5756f77592c9e>

Peyrone, M. (1845). Ueber die Einwirkung von Ammoniak auf Platinchlorür. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 55(2), 205-213. <https://doi.org/10.1002/jlac.18450550206>

Pinzón Martín, S., Seeberger, P. H., & Varón Silva, D. (2019). Mucins and Pathogenic Mucin-Like Molecules Are Immunomodulators During Infection and Targets for Diagnostics and Vaccines. *Frontiers in Chemistry*, 7, 710. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00710>

Pitroda, S. P., Khodarev, N. N., Beckett, M. A., Kufe, D. W., & Weichselbaum, R. R. (2009). MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5837-5841. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812029106>

Piyush, T., Rhodes, J. M., & Yu, L.-G. (2017). MUC1 O-glycosylation contributes to anoikis resistance in epithelial cancer cells. *Cell Death Discovery*, 3, 17044. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.44>

Ponnusamy, M. P., Seshacharyulu, P., Lakshmanan, I., Vaz, A. P., Chugh, S., & Batra, S. K. (2013). Emerging role of mucins in epithelial to mesenchymal transition. *Current Cancer Drug Targets*, 13(9), 945-956. <https://doi.org/10.2174/15680096113136660100>

-Q-

Quanyang, W., Yao, H., Sicong, W., Linlin, Q., Zewei, Z., Donghui, H., Hongjia, L., & Shijun, Z. (2024). Artificial intelligence in lung cancer screening : Detection, classification, prediction, and prognosis. *Cancer Medicine*, 13(7), e7140. <https://doi.org/10.1002/cam4.7140>

Quoix, E., Lena, H., Losonczy, G., Forget, F., Chouaid, C., Papai, Z., Gervais, R., Ottensmeier, C., Szczesna, A., Kazarnowicz, A., Beck, J. T., Westeel, V., Filip, E., Debieuvre, D., Madroszyk, A., Adam, J., Lacoste, G., Tavernaro, A., Bastien, B., ... Limacher, J.-M. (2016). TG4010 immunotherapy and first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (TIME) : Results from the phase 2b part of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *The Lancet. Oncology*, 17(2), 212-223. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00483-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00483-0)

-R-

Raina, D., Agarwal, P., Lee, J., Bharti, A., McKnight, C. J., Sharma, P., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2015). Characterization of the MUC1-C Cytoplasmic Domain as a Cancer Target. *PloS One*, 10(8), e0135156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135156>

Raina, D., Ahmad, R., Rajabi, H., Panchamoorthy, G., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2012). Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40(5), 1643-1649. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1308>

Raina, D., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2004). The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20607-20612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310538200>

Raina, D., Kosugi, M., Ahmad, R., Panchamoorthy, G., Rajabi, H., Alam, M., Shimamura, T., Shapiro, G. I., Supko, J., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2011). Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(5), 806-816. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-1050>

Rajabi, H. (2019). MUC1-C represses the RASSF1A tumor suppressor in human carcinoma cells. *Oncogene*. 38(47):7266-7277. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0940-1>

- Rajabi, H., Ahmad, R., Jin, C., Kosugi, M., Alam, M., Joshi, M. D., & Kufe, D. (2012). MUC1-C oncoprotein induces TCF7L2 transcription factor activation and promotes cyclin D1 expression in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10703-10713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323311>
- Rajabi, H., Alam, M., Takahashi, H., Kharbanda, A., Guha, M., Ahmad, R., & Kufe, D. (2014). MUC1-C oncoprotein activates the ZEB1/miR-200c regulatory loop and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 33(13), 1680-1689. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.114>
- Rajabi, H., Hiraki, M., & Kufe, D. (2018). MUC1-C activates polycomb repressive complexes and downregulates tumor suppressor genes in human cancer cells. *Oncogene*, 37(16), 2079-2088. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0096-9>
- Rajabi, H., Jin, C., Ahmad, R., McClary, C., Joshi, M. D., & Kufe, D. (2010). MUCIN 1 ONCOPROTEIN EXPRESSION IS SUPPRESSED BY THE miR-125b ONCOMIR. *Genes & Cancer*, 1(1), 62-68. <https://doi.org/10.1177/1947601909357933>
- Rajabi, H., & Kufe, D. (2017). *MUC1-C Oncoprotein Integrates a Program of EMT, Epigenetic Reprogramming and Immune Evasion in Human Carcinomas*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 1868(1):117122. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.03.003>
- Ramasamy, S., Duraisamy, S., Barbashov, S., Kawano, T., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2007). The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop. *Molecular Cell*, 27(6), 992-1004. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.031>
- Rami-Porta, R. (2021). Future Perspectives on the TNM Staging for Lung Cancer. *Cancers*, 13(8), 1940. <https://doi.org/10.3390/cancers13081940>
- Rancoule, C., Guy, J.-B., Vallard, A., Ben Mrad, M., Rehailia, A., & Magné, N. (2017). [50th anniversary of cisplatin]. *Bulletin Du Cancer*, 104(2), 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2016.11.011>
- Rass, E., Willaume, S., & Bertrand, P. (2022). 53BP1 : Keeping It under Control, Even at a Distance from DNA Damage. *Genes*, 13(12), 2390. <https://doi.org/10.3390/genes13122390>
- Reck, M., Remon, J., & Hellmann, M. D. (2024). First-Line Immunotherapy for Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 40(6):586-597. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01497>
- Ren, J., Agata, N., Chen, D., Li, Y., Yu, W., Huang, L., Raina, D., Chen, W., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2004). Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell*, 5(2), 163-175. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00020-0](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00020-0)
- Ren, J.-H., He, W.-S., Nong, L., Zhu, Q.-Y., Hu, K., Zhang, R.-G., Huang, L.-L., Zhu, F., & Wu, G. (2010). Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 25(1), 75-80. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0701>
- Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., & Menck, C. F. M. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance : An intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 73(suppl 1), e478s. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>

- Rosell, R., Codony-Servat, J., Nieto, J. G., Santarpia, M., Jain, A., Chandan, S., Wang, Y., Giménez-Capitán, A., Molina-Vila, M. A., Nilsson, J., & González-Cao, M. (2023). KRAS G12C-mutant driven non-small cell lung cancer (NSCLC). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 104228. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2023.104228>
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 205(4972), 698-699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>
- Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E., & Mansour, V. H. (1969). Platinum Compounds : A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, 222(5191), 385-386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>
- Rossi, A., & Di Maio, M. (2016). Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer : Optimal number of treatment cycles. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 16(6), 653-660. <https://doi.org/10.1586/14737140.2016.1170596>
- Roy, L. D., Sahraei, M., Subramani, D. B., Besmer, D., Nath, S., Tinder, T. L., Bajaj, E., Shanmugam, K., Lee, Y. Y., Hwang, S. I. L., Gendler, S. J., & Mukherjee, P. (2011). MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene*, 30(12), 1449-1459. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.526>
- Ryu, J.-S., Shin, E.-S., Nam, H.-S., Yi, H.-G., Cho, J.-H., Kim, C.-S., Kim, H.-J., & Lee, J.-E. (2011). Differential effect of polymorphisms of CMPK1 and RRM1 on survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine or taxane/cisplatin. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 6(8), 1320-1329. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182208e26>
- S-
- Safaei, R., Holzer, A. K., Katano, K., Samimi, G., & Howell, S. B. (2004). The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(10), 1607-1613. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.05.006>
- Santos, N. A. G. D., Ferreira, R. S., & Santos, A. C. D. (2020). Overview of cisplatin-induced neurotoxicity and ototoxicity, and the protective agents. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 111079. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111079>
- Sathish, G., Monavarshini, L. K., Sundaram, K., Subramanian, S., & Kannayiram, G. (2024). Immunotherapy for lung cancer. *Pathology, Research and Practice*, 254, 155104. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155104>
- Savary, G., Dewaeles, E., Diazz, S., Buscot, M., Nottet, N., Fassy, J., Courcot, E., Henaoui, I.-S., Lemaire, J., Martis, N., Van der Hauwaert, C., Pons, N., Magnone, V., Leroy, S., Hofman, V., Plantier, L., Lebrigand, K., Paquet, A., Lino Cardenas, C. L., ... Pottier, N. (2019). The Long Noncoding RNA DNM3OS Is a Reservoir of FibromiRs with Major Functions in Lung Fibroblast Response to TGF- β and Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(2), 184-198. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1237OC>

- Scagliotti, G. V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., Lee, J. S., Mellemgaard, A., Park, K., Patil, S., Rolski, J., Goksel, T., de Marinis, F., Simms, L., Sugarman, K. P., & Gandara, D. (2023). Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 41(14), 2458-2466. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.02544>
- Schmidt, E. V., Chisamore, M. J., Chaney, M. F., Maradeo, M. E., Anderson, J., Baltus, G. A., Pinheiro, E. M., & Uebele, V. N. (2020). Assessment of Clinical Activity of PD-1 Checkpoint Inhibitor Combination Therapies Reported in Clinical Trials. *JAMA Network Open*, 3(2), e1920833. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.20833>
- Semenza, G. L. (2011). Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 347-353. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010678>
- Shariati, M., & Meric-Bernstam, F. (2019). Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(11), 977-988. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1676726>
- Sheng, Y. H., Davies, J. M., Wang, R., Wong, K. Y., Giri, R., Yang, Y., Begun, J., Florin, T. H., Hasnain, S. Z., & McGuckin, M. A. (2022). MUC1-mediated Macrophage Activation Promotes Colitis-associated Colorectal Cancer via Activating the Interleukin-6/ Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Axis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 14(4), 789-811. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.06.010>
- Shigeta, K., Hasegawa, M., Kikuchi, E., Yasumizu, Y., Kosaka, T., Mizuno, R., Mikami, S., Miyajima, A., Kufe, D., & Oya, M. (2020). Role of the MUC1-C oncoprotein in the acquisition of cisplatin resistance by urothelial carcinoma. *Cancer Science*, 111(10), 3639-3652. <https://doi.org/10.1111/cas.14574>
- Shimizu, K., Yoshida, J., Nagai, K., Nishimura, M., Ishii, G., Morishita, Y., & Nishiwaki, Y. (2005). Visceral pleural invasion is an invasive and aggressive indicator of non-small cell lung cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 130(1), 160-165. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2004.11.021>
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin : Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>
- Singer, C. F., Pfeiler, G., Hubalek, M., Bartsch, R., Stöger, H., Pichler, A., Petru, E., Bjelic-Radisic, V., Greil, R., Rudas, M., Maria Tea, M.-K., Wette, V., Petzer, A. L., Sevelde, P., Egle, D., Dubsy, P. C., Filipits, M., Fitzal, F., Exner, R., ... Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group. (2020). Efficacy and safety of the therapeutic cancer vaccine tecemotide (L-BLP25) in early breast cancer : Results from a prospective, randomised, neoadjuvant phase II study (ABCSG 34). *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 132, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.03.018>
- Singh, P. K., Behrens, M. E., Eggers, J. P., Cerny, R. L., Bailey, J. M., Shanmugam, K., Gendler, S. J., Bennett, E. P., & Hollingsworth, M. A. (2008). Phosphorylation of MUC1 by Met modulates interaction with p53 and MMP1 expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 26985-26995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805036200>
- Sinn, B. V., von Minckwitz, G., Denkert, C., Eidtmann, H., Darb-Esfahani, S., Tesch, H., Kronenwett, R., Hoffmann, G., Belau, A., Thommsen, C., Holzhausen, H. J., Grasshoff, S. T., Baumann, K., Mehta, K., Dietel, M., & Loibl, S. (2013). Evaluation of Mucin-1 protein and mRNA expression as prognostic and predictive markers after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Annals of Oncology: Official*

Journal of the European Society for Medical Oncology, 24(9), 2316-2324.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdt162>

Situ, D., Wang, J., Ma, Y., Zhu, Z., Hu, Y., Long, H., & Rong, T. (2011). Expression and prognostic relevance of MUC1 in stage IB non-small cell lung cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 28 Suppl 1, S596-604. <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9752-4>

Soria, J.-C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., Okamoto, I., Zhou, C., Cho, B. C., Cheng, Y., Cho, E. K., Voon, P. J., Planchard, D., Su, W.-C., Gray, J. E., ... FLAURA Investigators. (2018). Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 378(2), 113-125. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137>

Sprowl, J. A., Ness, R. A., & Sparreboom, A. (2013). Polymorphic transporters and platinum pharmacodynamics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(1), 19-27.
<https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-12-rv-073>

Srivastava, S., & Riddell, S. R. (2015). Engineering CAR-T cells : Design concepts. *Trends in Immunology*, 36(8), 494-502. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.06.004>

Stein, C. A., Hansen, J. B., Lai, J., Wu, S., Voskresenskiy, A., Hög, A., Worm, J., Hedtjärn, M., Souleimanian, N., Miller, P., Soifer, H. S., Castanotto, D., Benimetskaya, L., Ørum, H., & Koch, T. (2010). Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Research*, 38(1), e3-e3. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp841>

Sun, Y., McCorvie, T. J., Yates, L. A., & Zhang, X. (2020). Structural basis of homologous recombination. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 77(1), 3-18. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03365-1>

Supruniuk, K., & Radziejewska, I. (2021). MUC1 is an oncoprotein with a significant role in apoptosis (Review). *International Journal of Oncology*, 59(3), 68. <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5248>

Suresh, R., Ali, S., Ahmad, A., Philip, P. A., & Sarkar, F. H. (2016). The Role of Cancer Stem Cells in Recurrent and Drug-Resistant Lung Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 890, 57-74.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-24932-2_4

-T-

Taddei, M. L., Giannoni, E., Fiaschi, T., & Chiarugi, P. (2012). Anoikis : An emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*, 226(2), 380-393. <https://doi.org/10.1002/path.3000>

Takano, M., Fujii, K., Kita, T., Kikuchi, Y., & Uchida, K. (2004). Amplicon profiling reveals cytoplasmic overexpression of MUC1 protein as an indicator of resistance to platinum-based chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Oncology Reports*, 12(6), 1177-1182.
<https://doi.org/10.3892/or.12.6.1177>

Tang, M.-S., Wu, X.-R., Lee, H.-W., Xia, Y., Deng, F.-M., Moreira, A. L., Chen, L.-C., Huang, W. C., & Lepor, H. (2019). Electronic-cigarette smoke induces lung adenocarcinoma and bladder urothelial hyperplasia in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(43), 21727-21731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911321116>

Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2018). Lung Cancers : Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers*, 10(8), 248. <https://doi.org/10.3390/cancers10080248>

Thompson, E. J., Shanmugam, K., Hatstrup, C. L., Kotlarczyk, K. L., Gutierrez, A., Bradley, J. M., Mukherjee, P., & Gendler, S. J. (2006). Tyrosines in the MUC1 cytoplasmic tail modulate transcription via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and nuclear factor-kappaB pathways. *Molecular Cancer Research: MCR*, 4(7), 489-497. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0038>

Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2022). Cancer chemotherapy : Insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Frontiers in Oncology*, 12, 960317. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.960317>

Tong, X., Dong, C., & Liang, S. (2024). Mucin1 as a potential molecule for cancer immunotherapy and targeted therapy. *Journal of Cancer*, 15(1), 54-67. <https://doi.org/10.7150/jca.88261>

Tosch, C., Bastien, B., Barraud, L., Grellier, B., Nourtier, V., Gantzer, M., Limacher, J. M., Quemeneur, E., Bendjama, K., & Prévile, X. (2017). Viral based vaccine TG4010 induces broadening of specific immune response and improves outcome in advanced NSCLC. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 5(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0274-x>

-W-

Wang, X., Lan, H., Li, J., Su, Y., & Xu, L. (2015). Muc1 promotes migration and lung metastasis of melanoma cells. *American Journal of Cancer Research*, 5(9), 2590-2604. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26609470/>

Wang, X., Zhou, Y., Wang, D., Wang, Y., Zhou, Z., Ma, X., Liu, X., & Dong, Y. (2023). Cisplatin-induced ototoxicity : From signaling network to therapeutic targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157, 114045. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114045>

Wang, Y., Mo, Y., Peng, M., Zhang, S., Gong, Z., Yan, Q., Tang, Y., He, Y., Liao, Q., Li, X., Wu, X., Xiang, B., Zhou, M., Li, Y., Li, G., Li, X., Zeng, Z., Guo, C., & Xiong, W. (2022). The influence of circular RNAs on autophagy and disease progression. *Autophagy*, 18(2), 240-253. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1917131>

Wei, X., Xu, H., & Kufe, D. (2005). Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell*, 7(2), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.008>

Wesseling, J., van der Valk, S. W., Vos, H. L., Sonnenberg, A., & Hilkens, J. (1995). Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *The Journal of Cell Biology*, 129(1), 255-265. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.1.255>

Wibbe, N., & Ebnet, K. (2023). Cell Adhesion at the Tight Junctions : New Aspects and New Functions. *Cells*, 12(23), 2701. <https://doi.org/10.3390/cells12232701>

Woo, J. K., Choi, Y., Oh, S.-H., Jeong, J.-H., Choi, D.-H., Seo, H.-S., & Kim, C.-W. (2012). Mucin 1 enhances the tumor angiogenic response by activation of the AKT signaling pathway. *Oncogene*, 31(17), 2187-2198. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.410>

- Wu, G., Kim, D., Kim, J. N., Park, S., Maharjan, S., Koh, H., Moon, K., Lee, Y., & Kwon, H.-J. (2018). A Mucin1 C-terminal Subunit-directed Monoclonal Antibody Targets Overexpressed Mucin1 in Breast Cancer. *Theranostics*, 8(1), 78-91. <https://doi.org/10.7150/thno.21278> (a)
- Wu, G., Maharjan, S., Kim, D., Kim, J. N., Park, B. K., Koh, H., Moon, K., Lee, Y., & Kwon, H.-J. (2018). A Novel Monoclonal Antibody Targets Mucin1 and Attenuates Growth in Pancreatic Cancer Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2004. <https://doi.org/10.3390/ijms19072004> (b)
- Wynder, E. L., & Graham, E. A. (1950). Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *Journal of the American Medical Association*, 143(4), 329-336. <https://doi.org/10.1001/jama.1950.02910390001001>

-X-

- Xu, F., Liu, F., Zhao, H., An, G., & Feng, G. (2015). Prognostic Significance of Mucin Antigen MUC1 in Various Human Epithelial Cancers : A Meta-Analysis. *Medicine*, 94(50), e2286. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002286>
- Xu, H., Du, Z., Li, Z., Liu, X., Li, X., Zhang, X., & Ma, J. (2024). MUC1-EGFR crosstalk with IL-6 by activating NF-κB and MAPK pathways to regulate the stemness and paclitaxel-resistance of lung adenocarcinoma. *Annals of Medicine*, 56(1), 2313671. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2313671>
- Xu, H., Gao, H., Li, H., Li, D., Yuan, W., Zhang, L., Cheng, P., Su, X., Li, Z., Wang, G., & Zhang, T. (2020). Downregulated Mucin 1 alleviates paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 22(4), 2966-2972. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11349>
- Xu, J., & Gewirtz, D. A. (2022). Is Autophagy Always a Barrier to Cisplatin Therapy? *Biomolecules*, 12(3), 463. <https://doi.org/10.3390/biom12030463>
- Xu, T., Li, D., Wang, H., Zheng, T., Wang, G., & Xin, Y. (2017). MUC1 downregulation inhibits non-small cell lung cancer progression in human cell lines. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*, 14(5):4443-4447. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5062>

-Y-

- Yamada, N., Nishida, Y., Tsutsumida, H., Hamada, T., Goto, M., Higashi, M., Nomoto, M., & Yonezawa, S. (2008). MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Research*, 68(8), 2708-2716. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6844>
- Yamamoto, M., Bharti, A., Li, Y., & Kufe, D. (1997). Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12492-12494. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12492>
- Yamamoto, M., Jin, C., Hata, T., Yasumizu, Y., Zhang, Y., Hong, D., Maeda, T., Miyo, M., Hiraki, M., Suzuki, Y., Hinohara, K., Rajabi, H., & Kufe, D. (2019). MUC1-C Integrates Chromatin Remodeling and PARP1 Activity in the DNA Damage Response of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, 79(8), 2031-2041. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3259>
- Yamasaki, M., Makino, T., Masuzawa, T., Kurokawa, Y., Miyata, H., Takiguchi, S., Nakajima, K., Fujiwara, Y., Matsuura, N., Mori, M., & Doki, Y. (2011). Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in

chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 104(4), 707-713. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606071>

-Y-

Yang, S.-C., Ou, H.-T., Su, W.-C., & Wang, S.-Y. (2023). Cost-effectiveness of first-line immunotherapies for advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Medicine*, 12(7), 8838-8850. <https://doi.org/10.1002/cam4.5632>

Yin, L., Huang, L., & Kufe, D. (2004). MUC1 oncoprotein activates the FOXO3a transcription factor in a survival response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45721-45727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408027200>

Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., Yokoyama, S., Kitamoto, S., Kitajima, S., & Goto, M. (2011). Mucins in human neoplasms : Clinical pathology, gene expression and diagnostic application. *Pathology International*, 61(12), 697-716. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2011.02734.x>

-Z-

Zarezadeh Mehrabadi, A., Tat, M., Ghorbani Alvanegh, A., Roozbahani, F., & Esmaeili Gouvarchin Ghaleh, H. (2024). Revolutionizing cancer treatment : The power of bi- and tri-specific T-cell engagers in oncolytic virotherapy. *Frontiers in Immunology*, 15, 1343378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1343378>

Zhang, A.-M., Chi, X.-H., Bo, Z.-Q., Huang, X.-F., & Zhang, J. (2019). MUC1 gene silencing inhibits proliferation, invasion, and migration while promoting apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. *Bioscience Reports*, 39(9), BSR20182193. <https://doi.org/10.1042/BSR20182193>

Zhang, D., Gao, J., Zhu, L., Hu, Z., Hou, R., Liu, S., Tan, M., Liu, J., & Lin, B. (2013). Chemoresistance is associated with MUC1 and Lewis y antigen expression in ovarian epithelial cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11024-11033. <https://doi.org/10.3390/ijms140611024>

Zhang, J., Ye, Z.-W., Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2021). Cisplatin chemotherapy and renal function. *Advances in Cancer Research*, 152, 305-327. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.03.008>

Zhang, Y.-H., Wu, Q., Xiao, X.-Y., Li, D.-W., & Wang, X.-P. (2010). Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell. *Cancer Letters*, 291(1), 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.10.003>

Zhao, Q., Piyush, T., Chen, C., Hollingsworth, M. A., Hilken, J., Rhodes, J. M., & Yu, L.-G. (2014). MUC1 extracellular domain confers resistance of epithelial cancer cells to anoikis. *Cell Death & Disease*, 5(10), e1438. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.421>

Zhao, Y.-Q., Wu, T., Wang, L.-F., Yin, B., Shi, M., Jiang, B., Gong-Sun, X., Song, X.-M., & Liu, X.-Y. (2021). Targeting MUC1-C reverses the cisplatin resistance of esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Translational Cancer Research*, 10(2), 645-655. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-2495>

Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 447-468. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>

- Zhou, R., Curry, J. M., Roy, L. D., Grover, P., Haider, J., Moore, L. J., Wu, S.-T., Kamesh, A., Yazdanifar, M., Ahrens, W. A., Leung, T., & Mukherjee, P. (2016). A novel association of neuropilin-1 and MUC1 in pancreatic ductal adenocarcinoma : Role in induction of VEGF signaling and angiogenesis. *Oncogene*, 35(43), 5608-5618. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.516>
- Zrihan-Licht, S., Weiss, M., Keydar, I., & Wreschner, D. H. (1995). DNA methylation status of the MUC1 gene coding for a breast-cancer-associated protein. *International Journal of Cancer*, 62(3), 245-251. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910620303>

Webographie :

<https://www.chuv.ch/fr/transplantation/cto-home/patients-et-familles/poumon/anatomie-et-physiologie>

<https://www.e-cancer.fr/Presse/Dossiers-et-communiques-de-presse/Panorama-des-cancers-en-France-l-Institut-national-du-cancer-publie-l-edition-2023-rassemblant-les-donnees-les-plus-recentes>

<https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Les-points-cles>

<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antimetabolites>

<https://www.academie-medecine.fr/le-dictionnaire/index.php?q=antim%C3%A9tabolites>

<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/microtubules>

https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT16452_DOCETAXEL_AMRING_QD_INS_Avis2_CT16452.pdf

