Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Implication de la protéine TMEM45A dans la chimiorésistance

Schmit, Kathleen

Award date:
2019

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 04. May. 2026

Université de Namur
Faculté des Sciences – Département de Biologie
Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS)
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)
Rue de Bruxelles, 61 ; B-5000 ; Belgique

Implication de la protéine TMEM45A dans la chimiorésistance

Dissertation présentée par
Kathleen Schmit
En vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Prof. Carine MICHIELS (promoteur)
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire,
NARILIS, UNamur

Prof. Lionel D'HONDT
Unité d'oncologie, CHU UCL Namur
NARILIS

Prof. Carlos GRAUX
Unité d'hématologie, CHU UCL Namur
NARILIS-BIOBANQUE

Prof. Agnès NOËL
Unité de recherche en biologie des
tumeurs et du développement
GIGA, ULiège

Prof. Jean-Pierre GILLET
Unité de Recherche en Physiologie
Moléculaire, NARILIS, UNamur

Prof. Yves POUMAY
Unité de Recherche en Physiologie
Moléculaire, NARILIS, UNamur

Février 2019

Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice de thèse, Carine Michiels, pour toute son aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Je lui suis reconnaissante pour sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'elle m'a prodigués. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire ainsi que de m'avoir intégrée dans votre équipe.

Je remercie le professeur Yves Poumay, le professeur Agnès Noël, le professeur Jean-Pierre Gillet, le professeur Carlos Graux et le professeur Lionel D'Hondt pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour leur participation scientifique ainsi que le temps qu'ils ont consacré à ma recherche. Ils ont pris le temps de m'écouter et de discuter avec moi. Pour tout cela je les remercie.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien financier de millions de gens qui par le biais du Télévie permettent à la recherche contre le cancer de progresser. Ils nous montrent par leurs dons qu'ils nous font confiance et je les en remercie.

Je tiens à remercier les techniciens du laboratoire qui m'ont aidée durant ces quatre années. Effectivement il faut un thésard pour réaliser une thèse mais que serions-nous sans Guy et Antoine qui réparent nos bêtises, qui trouvent des solutions pour rendre notre quotidien plus facile et notre environnement plus sécurisé. Je ne compte pas le nombre de fois où je suis allée les trouver et qu'ils m'ont aidée avec le sourire. Je remercie également Noëlle et Catherine d'être aussi patientes avec nous et de nous accompagner dans nos expériences. Je remercie aussi Martine pour tous ses conseils et son aide. Sans elle ça ne sera plus pareil. Merci à Marc pour ses petites remarques qui nous mettent le sourire aux lèvres. Et surtout un grand merci à Maude pour son aide précieuse durant ma thèse et surtout durant ma grossesse. Je la remercie de s'être occupée des souris avec moi et de m'avoir remplacée lorsque j'étais enceinte. Je suis consciente que c'était énormément de travail et je lui en suis très reconnaissante.

Merci aux membres de l'URBC (passés et présents) pour la bonne humeur au quotidien. C'était un réel plaisir de venir travailler le matin. Merci également aux seniors de l'URBC de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et merci pour leurs conseils, critiques et écoutes qui ont permis d'améliorer cette thèse.

Merci aux membres actuels et passés de l'équipe HIF/TumHyp ! Une super équipe qui a su m'apporter un support moral et intellectuel.

Remerciements

Un grand merci à mes collègues de bureau qui m'ont supporté moi et mon caractère durant quatre années. Je pense bien sûr à Eléonore, François et Victor qui m'ont écouté râler au sujet de mes expériences loupées mais également aidé à trouver des solutions. Merci pour les fous rires qui permettent de relâcher la pression. Merci à Sophie et Géraldine pour leur soutien inconditionnel. J'ai toujours pu compter sur elles que ce soit pour le travail ou dans le privé. Elles répondent toujours présent. Surtout Sophie qui m'a apporté son aide précieuse pour l'analyse du RNA sequencing, elle y a passé beaucoup d'heures et de soirées sans rien demander en retour. Merci aussi à Céline pour les moments détentes et ses supers cookies que je retrouvais sur mon bureau. Merci à Anne-Catherine d'être toujours présente pour nous et de nous aider avec le sourire. Ça a été un vrai plaisir de travailler avec toi. Merci à Camille et Sébastien M.

Merci également à Jia-Wei, tu as été une étudiante super, passionnée et souriante. Tu as contribué à l'élaboration de ce travail et j'ai été très contente de t'encadrer.

Et pour finir un énorme merci à Morgane qui m'a soutenue dès le début de ma thèse. Elle a su m'écouter et me conseiller dans les mauvais moments mais également partager ma joie dans les bons moments. Elle m'a accompagnée durant mes quatre années de thèse et je ne compte pas le temps que l'on a passé en salle de culture lentivirus. Merci d'avoir été présente.

Ils sont tous mes collègues mais après quatre années de rire, de doutes et de pleurs, ils sont devenus mes amis. Je ne les oublierais jamais.

Je voudrais également remercier ma famille pour leur soutien et leur écoute et plus particulièrement ma maman qui m'a poussé à aller toujours plus loin. Je me revois à 18 ans dans la cuisine à lui dire que je n'arriverais jamais jusqu'au master, que c'était trop difficile. Elle me répondait qu'il ne fallait pas baisser les bras et toujours essayer d'aller le plus loin possible pendant qu'il était encore temps. Et me voila 9 ans plus tard avec un doctorat. Alors merci pour tout.

Et le meilleur pour la fin. Je tiens à remercier Olivier. Il m'a soutenue durant ces quatre années de thèse. Il a quitté la France pour me suivre ici en Belgique et me permettre de réaliser ma thèse. Il a écouté chaque jour le récit de mes journées, de mes plaintes et de mes réussites sans rien dire même s'il ne comprenait pas ce que je lui racontais. Il m'a accompagné tout au long de cette aventure et je lui en suis très reconnaissante.

L'accomplissement d'une thèse est un travail de longue haleine et encore une fois merci à tous ceux qui ont rendu cela possible. En plus de l'expérience que m'a apporté mon travail, réaliser ma thèse au sein de l'URBC a été un vrai enrichissement personnel et je repars avec de très bons souvenirs.

Merci à tous.

Table des matières

Liste des abréviations I
Résumé IX
Summary XI
Introduction 1
Chapitre 1 : Le cancer *1*
1. Transformation des cellules normales en cellules cancéreuses *1*
2. Cancérogenèse *26*
2.1 Initiation *26*
2.2 Promotion *26*
2.3 Progression *3*
3. Microenvironnement tumoral *4*
3.1 Cellules immunitaires *4*
3.2 Les fibroblastes *5*
3.3 Cellules endothéliales et péricytes *6*
Conclusion *6*
Chapitre 2 : Hypoxie *7*
1. Définition *7*
2. HIF-1 ..... *8*
3. Régulation de HIF-1 ..... *8*
4. Cibles de HIF *10*
5. Hypoxie et cancer *11*
6. Hypoxie et résistance aux traitements *12*
Conclusion *14*
Chapitre 3 : Les protéines TMEM *15*
1. La super-famille TMEM *15*
2. La famille TMEM45 ..... *30*
3. TMEM45A *30*
4. TMEM45A dans les pathologies *31*
5. Expression de TMEM45A dans le cancer *32*
Conclusion *32*
Chapitre 4 : Cancer rénal *33*
1. Classification et caractéristiques des cancers rénaux *33*
1.1 RCC à cellules claires *34*
1.2 RCC papillaires *35*

Table des matières

1.3 RCC chromophobes *35*

2. Incidence, facteurs de risque et symptômes cliniques *36*

3. Traitements *36*

4. Le cancer rénal et TMEM45A *38*

5. Modèle cellulaire *38*

Conclusion *39*

Chapitre 5 : Cancer ORL *40*

1. Classification et caractéristiques des cancers ORL *40*

2. Incidence, facteurs de risque et symptômes cliniques *43*

3. Traitements *44*

4. Cancer ORL et TMEM45A *45*

5. Modèle cellulaire *46*

Conclusion *46*

Chapitre 6 : Cisplatine et mort cellulaire *47*

1. Mode d'action du cisplatine *47*

1.1 Dommages à l'ADN *48*

1.2 Angiogenèse *50*

1.3 Unfolded Protein Response *51*

1.4 Impact sur les cellules saines *53*

2. Mort cellulaire par apoptose *54*

2.1 Morphologie *54*

2.2 Les acteurs de l'apoptose *55*

2.2.1 Les caspases *55*

2.2.2 Activation des caspases initiatrices *56*

2.2.3 Activation des caspases effectrices *57*

2.2.4 Substrats clivés par les caspases effectrices *57*

2.3 Les voies de signalisation *58*

2.3.1 Voie intrinsèque de l'apoptose *58*

2.3.2 Voie extrinsèque de l'apoptose *59*

2.3.3 Apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique *60*

2.3.4 Voie de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN induits par le cisplatine *61*

Conclusion *63*

Chapitre 7 : Mécanismes de résistance au cisplatine *64*

1. Réduction de l'accumulation intracellulaire du cisplatine *64*

2. Inactivation du cisplatine *66*

Table des matières

3. Les voies de réparation des dommages à l'ADN 67
4. La survie cellulaire et l'inhibition de l'apoptose 68
4.1 p53 68
4.2 La voie des MAPKs 69
4.3 La voie PI3K/Akt 69
5. La voie UPR 70
6. Autres voies de résistance 71
6.1 Les facteurs de transcription 71
6.2 Heat shock proteins 72
6.3 Protéines ribosomales 73
6.4 Les microARNs 73
Conclusion 73
Objectifs 75
Résultats 76
Chapitre 1 : Mise au point des modèles cellulaires 76
1. Lignée cellulaire CAL27 76
1.1 Expression des gènes cibles de HIF en condition d'hypoxie 76
1.2 Sensibilité au cisplatine 76
2. Lignée cellulaire SQD9 78
2.1 Expression des gènes cibles de HIF en condition d'hypoxie 78
2.2 Sensibilité au cisplatine 78
3. Lignées cellulaires RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL 79
3.1 Expression des gènes cibles de HIF en condition d'hypoxie 80
3.2 Sensibilité au sunitinib 80
3.3 Sensibilité au cisplatine 82
Conclusion 82
4. Invalidation de l'expression de TMEM45A 83
4.1 Cellules CAL27 84
4.2 Cellules SQD9 86
4.3 Cellules RCC4 plus pVHL 86
Conclusion 88
Chapitre 2 : Rôle de la protéine TMEM45A dans la sensibilité au cisplatine 90
1. Impact de l'invalidation de TMEM45A dans les cellules Cal27 90
2. Article en soumission dans « International Journal of Cancer » 92
3. Résultats complémentaires 124

Table des matières

3.1 Impact de l'invalidation de TMEM45A par siARN dans les cellules SQD9 ..... *124*

3.2 Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'activité mitochondriale des cellules SQD9 ..... *124*

3.3 Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'expression des protéines pro-apoptotiques dans les cellules SQD9 ..... *127*

3.4 Impact de l'invalidation de TMEM45A sur les dommages à l'ADN induit par le cisplatine dans les cellules RCC4 plus pVHL *131*

3.5 Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'expression de poldip2 ..... *135*

Conclusion *135*

Chapitre 3 : Etude du rôle de la protéine TMEM45A in vivo *137*

1. Rôle de la protéine TMEM45A sur la croissance tumorale in vivo *137*

2. Etude histologique des tumeurs *139*

Conclusion *140*

Chapitre 4 : Matériels et méthodes complémentaires *141*

Discussion et perspectives 147

1. Expression de l'ARNm de TMEM45A dans divers types de cancer *147*

2. TMEM45A apporte-t-il un avantage aux cellules cancéreuses ? *148*

2.1 Rôle de TMEM45A dans les cellules CAL27 ..... *149*

2.2 Rôle de TMEM45A dans les cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL *150*

3. Double rôle de la protéine TMEM45A dans la chimiosensibilité au cisplatine *152*

3.1 TMEM45A et les dommages à l'ADN *152*

3.2 TMEM45A et l'activation de la voie UPR *154*

3.3 TMEM45A et l'apoptose *156*

4. TMEM45A a-t-il un rôle dans la croissance tumorale in vivo ? *157*

Conclusion générale *160*

Références 161

Liste des abréviations

5-FU	5-fluorouracil
ABC	ATP-binding casette
ABCB1	ATP-binding cassette transporter
ACPA	Analyse chromosomique sur puce à ADN
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine di-phosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
AKT	AKT Serine/Threonine Kinase
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
AQP	Aquaporin
ARG1	Arginase 1
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ASK1	Apoptosis signal regulating kinase 1
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATP7B	ATPase copper transporting beta
ATR	ATR serine/threonine kinase
BAD	Bcl-2 antagonist for cell death
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
BAP1	BRCA1 associated protein 1
BAX	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	Bcl-2, apoptosis regulator
Bcl2l2	Bcl-2 like 2
Bcl-Xl	Bcl-2 like 1
BER	Base excision repair
BH	Bcl-2 homology domain
BHD	Birt-Hogg-Dubé
bHLH	Basic helix loop helix

Liste des abréviations

Bid	BH3 interacting domain
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bir	Baculovirus IAP repeat
Bmf	Bcl-2-modifying factor
BNIP3	Bcl-2 nineteen kilodalton interacting protein
BRCA	Breast cancer susceptibility gene
Ca^{2+}	Calcium
c-Abl	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
CAD	Caspase-activated DNase
CAF	Cancer-associated fibroblast
CAIX	Carbonic anhydrase IX
CARD	Caspase-recruitment domain
Casp	Caspase
CBP	Creb binding protein
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma
CD31	Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM1
CdK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
chRCC	Chromophobe renal cell carcinoma
CHOP	Transcription factor C/EBP homologous protein
CpG	Cytosine phosphate guanine
CSA	ERCC excision repair 8 (ERCC8)
CSB	ERCC excision repair 6 (ERCC6)
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CTR1	Serine/threonine-protein kinase CTR1
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DFF-45	DNA fragmentation factor 45
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA-PKcs	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
DUF	Domain of unknown function
E2F1	E2F Transcription Factor 1
EEA1	Early endosome antigen 1

Liste des abréviations

EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF	Eukaryotic translation initiation factor
eIF2α	Eukaryotic initiation factor 2α
ErbB	Erb-B receptor tyrosine kinase
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EPO	Erythropoietin
ERAD	ER-associated degradation
ERCC1	ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Ets-1	ETS proto-oncogene 1, transcription factor
EXO1	Exonuclease 1
F4/80	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
c-FLIP	FADD-like IL-1β converting inhibitory protein
FADD	Fas-associated death domain
Fas	Fas cell surface death receptor
FBP	Fructose-bisphosphatase
FDA	Food and Drug Administration
FH	Fumarate hydratase
FIH	Factor inhibiting HIF
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FLCN	Folliculin
GADD45	Growth arrest and DNA damage gene 45
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GGR	Global genome repair
GMFB	Glia maturation factor beta
GRP78	Glucose regulated protein 78 kDa
GSH	Glutathione
H2AX	H2A histone family member X
HAT	Histone acetyltransferase
HIF	Hypoxia inducible factor
HIV	Human immunodeficiency virus
HLRCC	Hereditary leiomyomatosis and RCC
HOXD8	Homeobox D8
HPRCC	Hereditary papillary RCC

Liste des abréviations

HPV	Human papillomavirus
HR23B	RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein
HRAS	HRas proto-oncogene, GTPase
HRE	Hypoxia response element
Hrk	Harakiri, Bcl-2 interacting protein
HSP	Heat shock protein
ICAD	Inhibitor of CAD
ID	Inhibitory domain
Il-1	Interleukin 1
Il-6	Interleukin 6
Il-8	Interleukin 8
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IRE1	Inositol Requiring Enzyme 1
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
JNK	Jun N-terminal kinase
Ki67	Marker of proliferation Ki-67
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
Ku70	X-Ray repair cross complementing 6
Ku80	X-Ray repair cross complementing 5
L36	Ribosomal protein L36
L37	Ribosomal protein L37
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha
LDH	Lactate déshydrogenase
MANF	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCL	Bcl-2 family apoptosis regulator
MCM	Minichromosome maintenance complex component
MCP1	Monocyte chemotactic protein 1
MDM2	Murine double minute 2
MDR-1	Multidrug resistant gene 1
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
MMR	Mismatch repair
MRP	Multi-drug resistant protein
MSH	MutS homolog
MSL2	MSL complex subunit 2

Liste des abréviations

mTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase
MUTYH	MutY DNA glycosylase
NCK1	NCK adaptor protein 1
NEDD4-1	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4
NER	Nucleotide excision repair
NF-κB	Nuclear factor κB
NF-Y	Nuclear Transcription Factor Y
NHEJ	Non homologous end joining
ODDD	Oxygen degradation dependent domain
ORL	Oto-rhino-laryngologie
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
p38	Mitogen-activated protein kinase 14
p53	Tumor protein p53
p62	Sequestosome 1
p63	Tumor protein p63
p73	Tumor protein p73
PAR-3	Par-3 family cell polarity regulator
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymérase
PBRM1	Polybromo 1
PCAF1	p300/CBP-associated factor
PD-1	Programmed cell death 1
PDIA6	Protein disulfide isomerase family A member 6
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor alpha
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
PDI	Protein disulfide isomerase
PERK	PKR-like ER Kinase
PFK	Phosphofructokinase
PGK1	Phosphogkycérate kinase 1
PHD	Prolyl hydroxylase
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIDD	P53-induced death domain protein 1
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
PKC	Protein kinase C
PKM	Pyruvate kinase M
PLC	Phospholipase C
Pol	Polymérase
Poldip2	DNA polymerase delta interacting protein 2
PPP2R3A	Protein phosphatase 2 regulatory subunit B" subunit alpha
PTEN	Phosphatase with tensin homology deleted on chromosome 10
pVHL	Von Hippel-Lindeau
Rab	Member RAS oncogene protein
Rac1	Rac family small GTPase 1
Rad51	RAD51 recombinase
Rad52	RAD52 homolog, DNA repair protein
Raf	Raf-1 proto-oncogene serine/threonine kinase
RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with DD
Ras	HRas Proto-Oncogene GTPase
RCC	Renal cell carcinoma
pRCC	Papillary renal cell carcinoma
RE	Réticulum endoplasmique
RH	Recombination homologue
Rho	Rhodopsin
RICTOR	RAPTOR independent companion of mTOR complex 2
RIDD	Regulated IRE1 dependent RNA decay
RPA	Replication protein A1
RTK	Receptor tyrosine kinase
RT-qPCR	Reverse-transcription quantitative polymerization chain reaction
SEPT11	Septin 11
SETD2	SET domain containing 2
shARN	Short hairpin ARN
siARN	Small interfering ARN
Snail	Snail family transcriptional repressor 1
STAG1	Stromal antigen 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAD	Transactivation domain

TAMs	Tumor-associated macrophages
TCR	Transcription-coupled repair
TEDDM	Transmembrane epididymal protein
TGF-α	Transforming growth factor alpha
TGF-ß	Transforming growth factor beta
TIMP-1	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1
TLR7	Toll like receptor 7
TMEM	Transmembrane protein
TMEM22	Transmembrane protein 22
TMEM205	Transmembrane protein 205
TMEM45A	Transmembrane protein 45 A
TMEM45B	Transmembrane protein 45 B
TMEM45C	Transmembrane protein 45 C
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TRADD	TNFRSF1A associated via death domain
TRAF2	TNF-receptor-associated factor 2
TRAILR1	TNF receptor superfamily member 10a
TWIST	Twist related protein
UQCR10	Ubiquinol-cytochrome C reductase, complex III subunit X
UPR	Unfolded protein response
3'UTR	3'-untranslated region
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPS26	Vesicle protein sorting 26A
XBP1	X-box binding protein 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XPB	Xeroderma pigmentosum group B-complementing protein (ERCC3)
XPC	Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein
XPD	Xeroderma pigmentosum group D-complementing protein (ERCC2)
XPG	Xeroderma pigmentosum group G-complementing protein (ERCC5)

XPF	Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein (ERCC4)
Zeb-1	Zinc finger E-box binding homeobox 1

Résumé

Malgré le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre le cancer, une résistance aux traitements restent présentes. Cette résistance peut provenir soit de modifications des cellules cancéreuses préalables au traitement, elle est alors dite « intrinsèque », soit de modifications induites par les traitements, elle est alors appelée « adaptative ». De plus, le microenvironnement tumoral et en particulier l'hypoxie (1% O_2) modulent également la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques. En absence d'oxygène, les cellules cancéreuses activent des voies de signalisation en réponse au stress que représente l'hypoxie. Dans ces conditions, le facteur de transcription HIF-1 est stabilisé et active la transcription de gènes cibles tels que *TMEM45A.* Ce gène code pour une protéine peu caractérisée possédant des propriétés anti-apoptotiques et impliquée dans la résistance des cellules d'hépatocarcinome et des cellules de cancer du sein aux agents chimiothérapeutiques. Le but de cette thèse est de poursuivre l'étude du rôle de la protéine TMEM45A dans la modulation de la réponse des cellules cancéreuses aux traitements et d'identifier par quels mécanismes cette protéine pourrait conférer une résistance aux agents chimiothérapeutiques.

L'implication de TMEM45A dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques a été étudiée dans deux modèles de cancer : le cancer de la tête et du cou (cellules SQD9) et le cancer du rein (cellules RCC4 plus pVHL). Pour ces deux types de cancer, l'ARNm de TMEM45A est surexprimé dans le tissu tumoral comparé au tissu sain adjacent chez les patients. La sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine a été analysée *in vitro* après invalidation de l'expression de TMEM45A par siARN ou shARN. L'invalidation de cette protéine entraine un ralentissement du cycle cellulaire et une modification de la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine. De façon très inattendue, une sensibilisation des cellules SQD9 mais une résistance des cellules RCC4 plus pVHL sont observées. Dans le but d'identifier par quels mécanismes TMEM45A intervient dans la modulation de la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques, une analyse transcriptomique a été réalisée. L'induction et la réparation des dommages à l'ADN induits par le cisplatine et l'activation de la voie UPR ont été investiguées de façon plus approfondie. Les résultats montrent que la protéine TMEM45A joue un rôle dans la sensibilité au cisplatine par une modulation de l'activation de la voie UPR menant à une résistance des cellules RCC4 plus pVHL et/ou par une dérégulation des voies de réparation des dommages à l'ADN induits par le cisplatine menant à une sensibilisation des cellules SQD9.

L'étude de TMEM45A a été approfondie par des expériences *in vivo.* L'invalidation de l'expression de TMEM45A entraine une augmentation de la croissance tumorale *in vivo,* probablement due à une modulation du recrutement des cellules immunitaires au site tumoral.

Résumé

La protéine TMEM45A joue un rôle certain dans la réponse des cellules de cancer de la tête et du cou et de cancer du rein aux agents chimiothérapeutiques mais également dans la croissance tumorale *in vivo*. La prochaine étape est l'étude du rôle de TMEM45A dans la réponse aux traitements *in vivo*. L'ensemble de nos résultats conforte l'implication de TMEM45A dans l'agressivité tumorale et suggère que TMEM45A pourrait être utilisé comme cible d'agents chimiosensibilisants dans certains types de cancer, mais également comme marqueur de réponse aux traitements chez les patients.

Summary

Successful remission can be achieved with chemotherapy in most cases of cancer but refractory diseases and relapses remain a major obstacle. Resistance to treatment can appear by intrinsic adaptation of cancer cells themselves but also by features of the tumor microenvironment, and more specifically hypoxia (1% O_2). In the absence of oxygen, some signaling pathways are activated in cancer cells in order to response to the stress that represents hypoxia. In this condition, the transcription factor HIF-1 is stabilized leading to the transcription of several target genes such as *TMEM45A*. This gene codes for a protein not yet well characterized, which displays strong anti-apoptotic properties and which seems to be involved in the resistance of hepatocellular carcinoma cells and breast cancer cells to chemotherapeutic drugs. The aim of the project is to pursue the study of the contribution of this protein in modulating the responses to treatment and of the mechanisms by which it acts.

The role of TMEM45A in the resistance to chemotherapy has been studied in two models: head and neck squamous cell carcinoma (SQD9 cells) and renal cell carcinoma (RCC4 plus pVHL). For these two types of cancer a high level of TMEM45A mRNA expression in comparison to the adjacent healthy tissue has been observed in patients. The sensitivity of cancer cells to cisplatin in these models has been analyzed after silencing of TMEM45A expression by siRNA and shRNA. The invalidation of TMEM45A leads to a decrease in the proliferation rate and a modification in cell sensitivity to cisplatin with an increase in drug sensitivity for SQD9 cells and an increase in drug resistance for RCC4 plus pVHL cells. To identify the mechanisms responsible for this phenotype, we performed an RNA-sequencing analysis. Then DNA damage induction and repair but also the activation of the UPR signaling pathway have been investigated. TMEM45A influences the drug sensitivity of cancer cells depending on the cancer type through a modulation of cisplatin-activation of UPR pathway leading to the resistance of RCC4 plus pVHL cells, whereas it increased SQD9 cell sensitivity to cisplatin through the deregulation of cell responses to cisplatin-induced DNA damage.

The study of TMEM45A has been deepened by *in vivo* experiments. The invalidation of TMEM45A expression led to an increase in tumor growth probably due to a modulation of immune cell recruitment to the tumor site.

TMEM45A plays a significant role in the head and neck squamous cell carcinoma and renal cell carcinoma drug sensitivity. Furthermore, this protein seems to be involved in tumor growth *in vivo*. The next step is to study the implication of TMEM45A in response to treatment *in vivo*. Altogether our data emphasize the involvement of TMEM45A in tumor aggressiveness and suggest that TMEM45A might be a putative target to develop new chemosensitizing agents at least in some cancer types or used as a marker of patient responses to treatment.

Introduction

Chapitre 1 : Le cancer

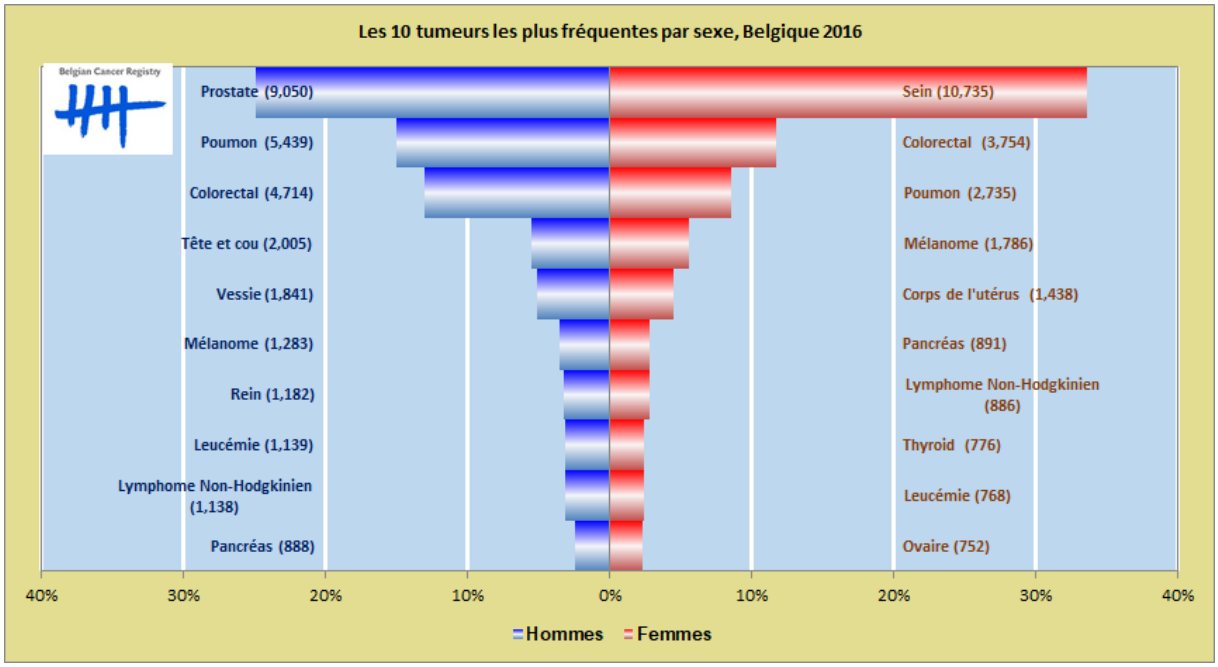
L'amélioration des conditions socio-économiques et les progrès de la médecine ont permis une augmentation importante de l'espérance de vie. Cependant, les répercussions des modifications de l'environnement et des modes de vie sur l'augmentation de l'incidence de certains cancers sont devenues une préoccupation majeure de santé publique. Le cancer constitue la deuxième cause de décès dans le monde. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé a recensé 8,8 millions de morts en 2015. Le cancer touche environ un homme sur trois et une femme sur quatre. Les cancers les plus diagnostiqués en Belgique en 2016 sont repris dans la figure I1.

Au niveau biologique, le cancer est provoqué par l'apparition successive, au niveau du génome, de mutations qui, progressivement, transforment une cellule saine en cellule cancéreuse dite « initiée », caractérisée par une prolifération anarchique. En se multipliant, les cellules dites transformées donnent naissance à une masse tumorale.

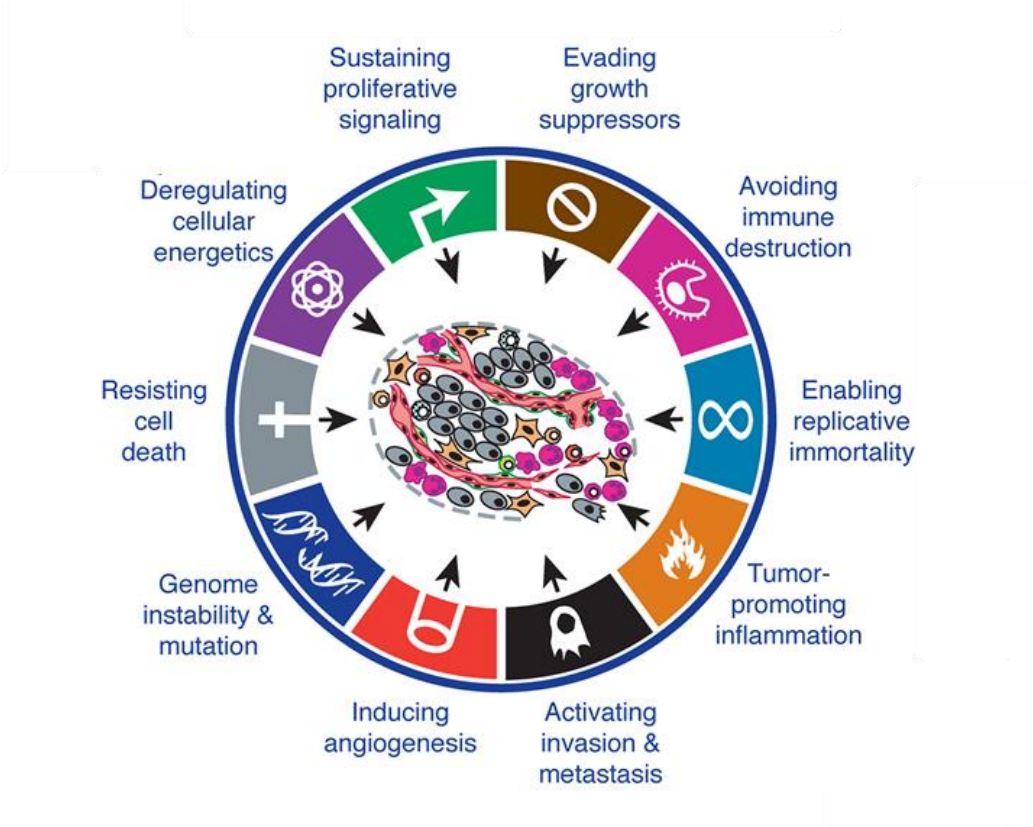
1. Transformation des cellules normales en cellules cancéreuses

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est un processus multifactoriel, c'est-à-dire lié à une association de plusieurs facteurs, dont le rôle et l'importance dans le développement de la maladie sont variables (Barrett and Wiseman 1987). Ces facteurs comprennent : les caractéristiques de l'individu (âge, sexe et caractéristiques héréditaires), le comportement individuel et le mode de vie (consommation d'alcool ou de tabac, alimentation et activité physique) mais également l'exposition à des substances ou situations à risque présentes dans l'environnement. Ces facteurs environnementaux peuvent être classés en 3 catégories : les cancérogènes physiques regroupant le rayonnement ultraviolet et les radiations ionisantes, les cancérogènes chimiques, comme l'amiante ou les composants de la fumée du tabac et les cancérogènes biologiques comprenant les virus (HIV, HPV), bactéries et parasites (schistosome).

L'ensemble de ces facteurs entraine l'apparition de mutations généralement sporadiques au cours de la vie d'un individu. Cependant, certaines mutations peuvent être directement héritées et donner un caractère héréditaire au cancer. C'est le cas du cancer du sein, pour lequel des mutations survenant dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont responsables de 5 à 10% des cancers du sein (Campeau, Foulkes et al. 2008). Ces gènes sont des gènes suppresseurs de tumeur, ainsi la cancérogenèse est favorisée si une mutation entraine une perte de fonction d'une de ces deux protéines (Barrett and Wiseman 1987). C'est également le cas pour le cancer du côlon dont 2%



<u>Figure I1</u> : Incidence des 10 cancers les plus recensés chez les hommes et les femmes en Belgique en 2016. (Cancer Fact Sheets, Registre du Cancer, année d'incidence 2015, Bruxelles 2018)



<u>Figure I2</u> : Représentation des propriétés acquises par les cellules cancéreuses nécessaires à l'initiation de la cancérogenèse. (Hanahan and Weinberg 2011)

à 5% de l'ensemble des cancers du côlon sont provoqués par des syndromes héréditaires tels que le syndrome de Lynch, le syndrome de Gardner (ou la polypose adénomateuse familiale associée aux mutations du gène *APC*) et la polypose associée aux mutations bi-alléliques du gène *MUTYH* (Jasperson, Tuohy et al. 2010).

2. *Cancérogenèse*

2.1 Initiation

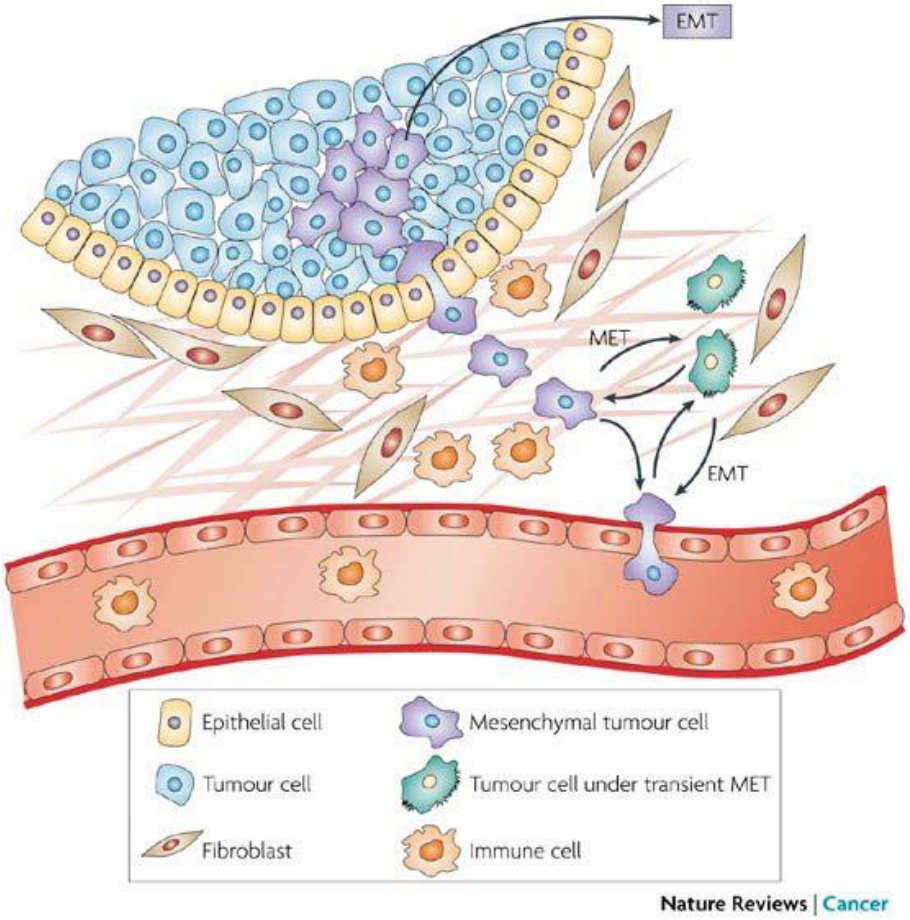
La cancérogenèse est définie par un ensemble d'évènements qui conduisent à la transformation d'une cellule normale en un tissu cancéreux. Ces évènements correspondent à une accumulation successive d'altérations génétiques et épigénétiques à mesure des divisions cellulaires, mais également à l'acquisition progressive de propriétés par les cellules cancéreuses, on parle alors de phase d'initiation de la cancérogenèse. Il a été proposé par R.A Weinberg et D. Hanahan que la transformation d'une cellule normale à une cellule cancéreuse passait par l'acquisition d'au moins 8 propriétés (figure I2) :

- L'indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération
- L'insensibilité aux signaux inhibiteurs
- L'abolition de l'apoptose
- Une capacité prolifération illimitée
- Une capacité à susciter l'angiogenèse
- L'acquisition d'un pouvoir invasif
- Une reprogrammation du métabolisme énergétique
- Une résistance à la destruction par les cellules du système immunitaire

Comme décrit par Hanahan et Weinberg, l'acquisition de ces huit propriétés est possible par l'instabilité génétique et les mutations, mais également par l'inflammation comme moteur de la tumorigénèse (Hanahan and Weinberg 2011).

2.2 Promotion

La phase d'initiation est suivie par une phase de promotion durant laquelle les cellules cancéreuses initiées prolifèrent de façon anarchique jusqu'à former des sous-populations clonales. Cette phase est accompagnée d'une néovascularisation importante. En effet, comme les tissus sains, les tumeurs nécessitent un apport continu et croissant en nutriments et en oxygène, mais également l'élimination des déchets. Afin de répondre à cette demande, le réseau de vaisseaux sanguins déjà en place doit s'étendre et se densifier à proximité du site tumoral.



<u>Figure I3</u> : Représentation schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse, processus dynamique reflétant la plasticité des cellules épithéliales. (Peinado, Olmeda et al. 2007)

L'angiogenèse, formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux préexistants, prend alors place dans la zone périphérique de la tumeur. La prolifération des cellules endothéliales est de ce fait très active produisant de nouveaux vaisseaux souvent anormaux. En effet, ce sont des canaux à paroi mince plutôt de type veinulaire, irrégulièrement anastomosés avec de nombreux culs-de-sac. L'angiogenèse soutient la croissance tumorale, mais permet également le développement des métastases lors de la phase d'invasion.

2.3 Progression

Les tumeurs solides se divisent en deux catégories : les carcinomes et les sarcomes. Les cellules épithéliales dont sont issues les cellules cancéreuses de carcinome sont liées entre elles et elles sont fixées à la matrice extracellulaire qui les entoure les maintenant immobiles. Lors d'une blessure, pour devenir mobiles, les cellules épithéliales effectuent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui les transforme temporairement en cellules mésenchymateuses pour qu'elles puissent migrer sur le site de la blessure. En effet, décrite au début des années 1980, l'EMT est un processus durant lequel les cellules épithéliales perdent les caractéristiques qui les définissent telles que l'adhérence cellulaire ou la polarité apico-basale et acquièrent un phénotype mésenchymateux. Les cellules cancéreuses exploitent ce processus naturel de transformation cellulaire, ce qui leur donne la capacité de migration et ainsi de se déplacer. Une fois que les cellules cancéreuses sont parvenues à passer la membrane basale qui les maintenait séparées du mésenchyme, elles peuvent migrer à proximité des vaisseaux sanguins qui pourront leur permettre d'atteindre un nouveau tissu lors du processus métastatique (figure I3) (Peinado, Olmeda et al. 2007). Les sarcomes quant à eux, constituent une grande famille hétérogène de tumeurs rares qui dérivent d'une cellule mésenchymateuse et non épithéliale. Ces tumeurs peuvent se développer au niveau des tissus mous tels que le tissu adipeux, les muscles et les viscères ou au niveau des parties dures du corps comprenant les os et le cartilage. Les sarcomes sont caractérisés par une grande hétérogénéité au niveau histologique et génétique rendant l'identification de cibles thérapeutiques difficile (Ferrari, Sultan et al. 2011, Mohseny and Hogendoorn 2011, Porporato, Payen et al. 2012, Arora and Riddle 2018, Genadry, Pietrobono et al. 2018). On distingue alors deux catégories de tumeur. Les tumeurs bénignes dont la masse est bien délimitée, l'histologie du tissu reste semblable au tissu sain et les cellules composant la masse sont régulières. Ces tumeurs sont caractérisées par une croissance lente, l'absence de métastases et très peu de récidives locales après exérèse de la tumeur. A l'opposé, il existe également des tumeurs malignes dont la masse n'est pas limitée ou encapsidée, l'histologie du tissu est différente du tissu sain avec dédifférenciation ou différenciation aberrante et les cellules ont souvent une morphologie irrégulière. La croissance de ces tumeurs malignes est rapide entrainant une destruction des tissus avoisinants. Ces tumeurs sont caractérisées par le développement de métastases et présentent souvent une récidive locale après exérèse de la tumeur.

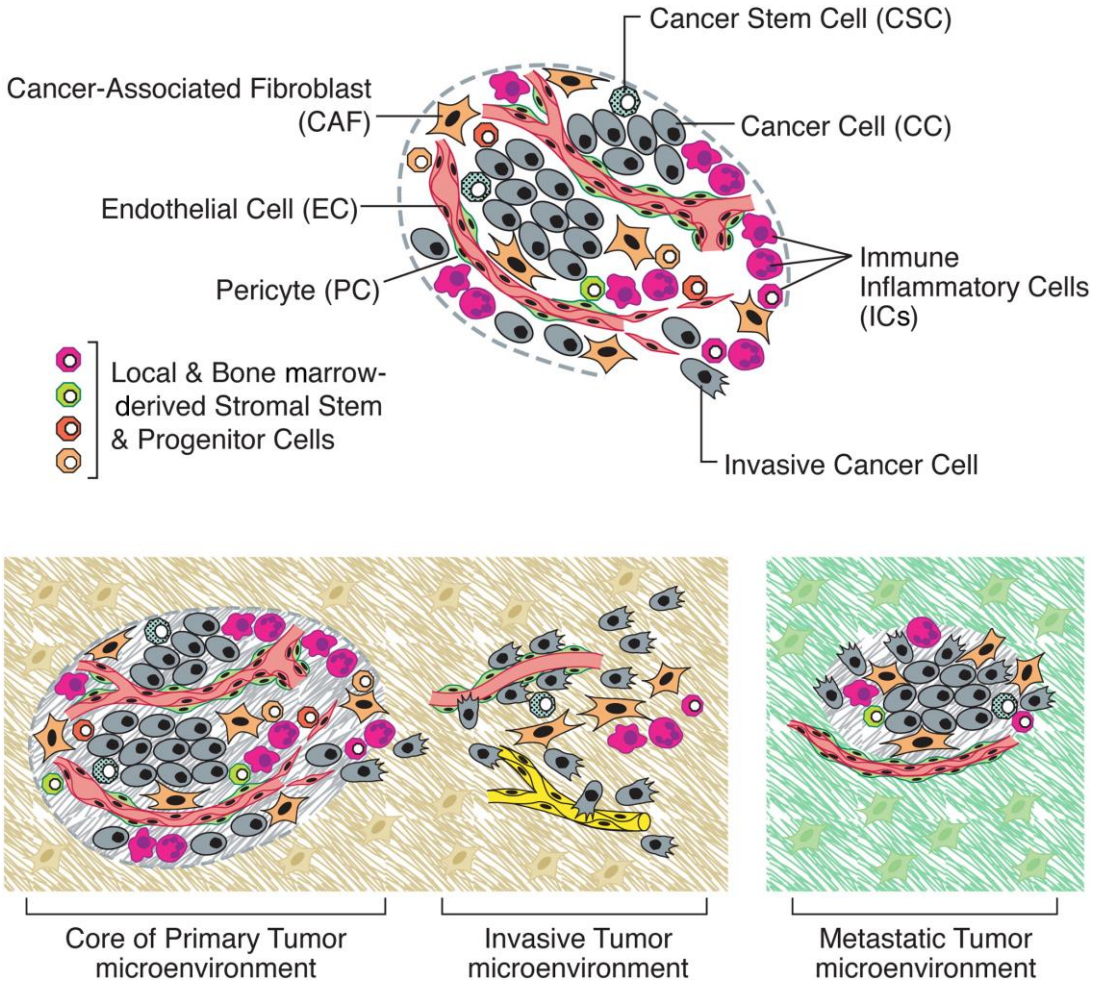


Figure I4 : Composition du microenvironnement tumoral. La partie supérieure de la figure représente les différents types cellulaires composant le microenvironnement tumoral. Ces différentes classes de cellules participent à la croissance et à la progression des tumeurs solides. La partie inférieure de la figure schématise les modulations de la composition du stroma en fonction de la progression tumorale. (Hanahan and Weinberg 2011)

3. Microenvironnement tumoral

Le développement d'une tumeur est classiquement présenté comme un processus de sélection de cellules cancéreuses ayant acquis des anomalies leur conférant un avantage de croissance, suivies de vagues d'expansions clonales. Cependant, au cours de ces dix dernières années, de très nombreuses observations ont mis en évidence l'importance des interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement au cours des différentes étapes de la cancérogenèse. Les cellules cancéreuses communiquent entre elles et avec le stroma environnant de manière dynamique. Cette communication se fait parfois de manière directe, par le biais de complexes jonctionnels et, le plus souvent, par des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire (hormones, facteurs de croissance, chémokines, etc.) agissant sur des récepteurs spécifiques à la surface de leurs cibles cellulaires. Le microenvironnement tumoral diffère du microenvironnement « normal » par la composition biochimique de la matrice extracellulaire et par le fait que les populations cellulaires du stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunes, etc.), bien que non transformées, sont contrôlées par les cellules cancéreuses pour répondre à leurs propres besoins (figure I4).

3.1 Cellules immunitaires

L'étude du microenvironnement tumoral s'est longtemps limitée au domaine de l'immunologie. L'infiltrat immunitaire tumoral comprend principalement les macrophages, cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Ces cellules se retrouvent à chaque stade du développement tumoral. Les macrophages constituent la première ligne de défense contre les pathogènes. De nombreuses études ont montré que les macrophages sont présents dans la majorité des tumeurs au sein desquelles ils adoptent un phénotype spécifique. On parle alors de TAMs pour « macrophages associés aux tumeurs » (tumor-associated macrophages). Les TAMs peuvent être polarisés soit en macrophages M1 pro-inflammatoires, soit en macrophages M2 anti-inflammatoires. Les macrophages M1 possèdent un phénotype antitumoral alors que les macrophages M2 sont pro-angiogéniques et ont été impliqués dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Suarez-Lopez, Sriram et al. 2018). La présence de ces deux populations de macrophages est utilisée comme marqueur de pronostic pour certains cancers. C'est le cas par exemple du cancer du sein pour lequel la présence de macrophages M2 dans le stroma a été corrélée à des tumeurs de haut grade et de grande taille (Medrek, Ponten et al. 2012). C'est aussi le cas du cancer du poumon dans lequel la présence de macrophages M2 dans le microenvironnement a été associée à une faible durée de survie moyenne des patients (Jackute, Zemaitis et al. 2018). Des études réalisées sur les macrophages associés aux tumeurs ont également mis en évidence l'implication des cellules immunitaires innées dans la progression tumorale. Ces études ont révélé que les macrophages sont capables de fournir des protéases telles que les cathepsines B et S afin de promouvoir la croissance

tumorale et la formation de métastases (Gocheva, Wang et al. 2010, Quail and Joyce 2013). La capacité des macrophages à être reprogrammés d'un phénotype M2 vers M1, notamment par les techniques d'irradiation font d'eux une intéressante cible pour le développement de nouvelles thérapies (Genard, Wera et al. 2018).

L'infiltrat immunitaire comprend également les lymphocytes. Les lymphocytes sont des globules blancs qui aident le corps à lutter contre les infections. Ils sont fabriqués dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques, puis circulent dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les lymphocytes identifient les cellules étrangères et agissent rapidement pour les détruire. Il existe deux types principaux de lymphocytes : les lymphocytes B et les lymphocytes T. Ces derniers aident le corps à lutter contre les infections virales et détruisent les cellules cancéreuses ou anormales.

Le système immunitaire ne parvient pas toujours à détecter et éliminer les cellules cancéreuses. En effet, certaines cellules cancéreuses développent des mécanismes qui leur permettent d'échapper au système immunitaire. L'une des plus récentes stratégies mises en évidence est le contournement de l'étape de fixation du lymphocyte T à la cellule cancéreuse. Elle met en jeu la voie PD-1/PD-L1, principale voie d'inhibition des lymphocytes T, qui est surexprimée dans les cellules cancéreuses, ce qui leur permet d'échapper au système immunitaire (Lu and Finn 2008, Chen, Irving et al. 2012). De récentes études ont mis en évidence l'intérêt thérapeutique de cette voie de signalisation. Cependant, des voies de résistance contre les traitements ciblant PD-1/PD-L1 ont déjà été observées dans certains types de cancer comme le cancer de la tête et du cou (Shayan, Srivastava et al. 2017).

3.2 Les fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules peu différenciées, précurseurs du tissu conjonctif dérivant de cellules du mésenchyme. Les fibroblastes sont présents dans le derme où ils produisent les composants de la matrice extracellulaire comme les fibres de collagène et l'élastine. En condition tumorale, les fibroblastes peuvent être activés par des facteurs de croissance tels que le TGF-ß (transforming growth factor ß), des chémokines telles que MCP1 (monocyte chemotactic protein 1) et/ou des protéases dégradant la matrice extracellulaire. Cette activation conduit à une sécrétion accrue de protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I, la ténascine C et la fibronectine. Ces fibroblastes activés sont appelés CAF, pour « fibroblastes associés aux cancers » (cancer-associated fibroblasts) (Hanahan and Coussens 2012).

3.3 Cellules endothéliales et péricytes

Les cellules endothéliales, dérivées de cellules du mésenchyme, tapissent la face interne des vaisseaux et assurent leur intégrité. L'induction permanente de l'angiogenèse au sein d'une tumeur entraine une prolifération importante de ces cellules au sein du microenvironnement tumoral (Hanahan and Coussens 2012).

Les péricytes, aussi appelées cellules de Rouget, sont des cellules dites « murales » retrouvées le long de la lame basale de l'endothélium des capillaires. Contenant des fibres contractiles, ces cellules peuvent également être classées en cellules musculaires lisses. Ces cellules longtemps décrites comme étant absentes de la néovasculature tumorale ont récemment été associées à la vascularisation de la plupart des tumeurs. Les péricytes ont été également définis comme médiateurs de nombreux processus associés avec la progression tumorale tels que l'angiogenèse et la formation de métastases (Bergers and Song 2005, Raza, Franklin et al. 2010). En effet, les modifications d'expression de facteurs pro-angiogéniques observées au sein d'une tumeur entrainent un remodelage constant des vaisseaux sanguins. Ce remodelage implique la formation et la régression simultanée de vaisseaux, stimulant de façon aberrante la formation et l'activation des péricytes.

Conclusion

La cancérogenèse est un processus complexe et multifactoriel. De plus, il a été mis en évidence que la croissance tumorale ne dépendait pas uniquement des cellules cancéreuses, mais également du microenvironnement qui entoure la tumeur. Les différents composants du microenvironnement tumoral influencent non seulement la prolifération des cellules cancéreuses, l'angiogenèse et la formation de métastases, mais également la résistance aux traitements (McMillin, Negri et al. 2013). D'autres conditions environnementales peuvent façonner activement le développement tumoral. C'est le cas de l'acidité, de la présence de facteurs de croissance ou encore de l'hypoxie qui nous intéressera plus particulièrement dans le cadre de cette thèse (Junttila and de Sauvage 2013). La compréhension du microenvironnement tumoral est essentielle pour le développement de traitements ciblant une tumeur dans tous ses aspects : les cellules cancéreuses, bien sûr, mais également le milieu qui leur permet de croître et de se propager. De tels traitements issus de la recherche sur le microenvironnement tumoral, plutôt que sur la cellule cancéreuse elle-même sont d'ailleurs déjà utilisés aujourd'hui et ciblent principalement l'angiogenèse (bévacizumab, sunitinib, sorafenib, etc.).

Chapitre 2 : Hypoxie

1. Définition

Comme décrit précédemment, la croissance tumorale, provoque l'apparition de zones, au cœur de la tumeur solide, où l'apport sanguin et, par conséquent l'apport en oxygène et nutriments, sont diminués. Ce phénomène, appelé hypoxie, correspond à une pression partielle en oxygène inadaptée, qui impacte les tissus et les fonctions cellulaires. De nombreuses études ont révélé que 50 à 60% des tumeurs solides avancées présentaient des zones d'hypoxie distribuées de façon hétérogène au sein de la tumeur (Vaupel and Mayer 2007).

Lorsque notre organisme vient à manquer d'oxygène, le corps s'adapte, afin de maintenir une oxygénation optimale des cellules. Premièrement, des adaptations systémiques permettant une meilleure circulation et diffusion de l'oxygène au niveau des tissus se mettent en place. Ces adaptations comprennent une hyperventilation pulmonaire, une dilatation des vaisseaux sanguins et une inhibition de la vasoconstriction permettant d'augmenter l'apport en oxygène au sein des tissus (Heistad and Abboud 1980).

Dans un second temps, au niveau cellulaire, un switch métabolique de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse se met en place afin de préserver la production d'ATP en absence d'oxygène. De plus, les processus non essentiels à la survie cellulaire et consommateurs d'énergie tels que la synthèse protéique sont inhibés. En effet, en condition d'hypoxie, la synthèse protéique est diminuée de 60 à 70% par une inhibition de la phase d'initiation de la traduction des ARNm en protéines (Wouters, van den Beucken et al. 2005). L'hypoxie peut également entrainer une accumulation de protéines mal conformées au sein du réticulum endoplasmique et ainsi activer la voie UPR (Unfolded Protein Response) (Zhang and Kaufman 2006). La voie UPR sera présentée plus en détail dans le chapitre 6 de l'introduction.

Au niveau moléculaire, l'hypoxie, par l'intermédiaire de voies de réponse spécifiques comme celle des protéines de la famille HIF (Hypoxia Inducible Factor), induit l'activation de plusieurs voies de signalisation. Ces voies régulent de nombreux processus cellulaires tels que l'angiogenèse, le métabolisme, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore le remodelage tissulaire (Harris 2002, Michiels 2004, Semenza 2012).

Il existe deux types d'hypoxie : l'hypoxie cyclique provoquée par une fluctuation spatiale et temporelle du niveau d'oxygène et l'hypoxie chronique qui, elle, persiste dans le temps. Les voies de signalisations activées en réponse à l'hypoxie cyclique diffèrent de celles activées en condition d'hypoxie chronique. Cependant, ces deux types d'hypoxie mènent à une augmentation de l'angiogenèse, de l'inflammation tumorale, de la formation de métastases et de la résistance aux traitements (Michiels, Tellier et al. 2016).

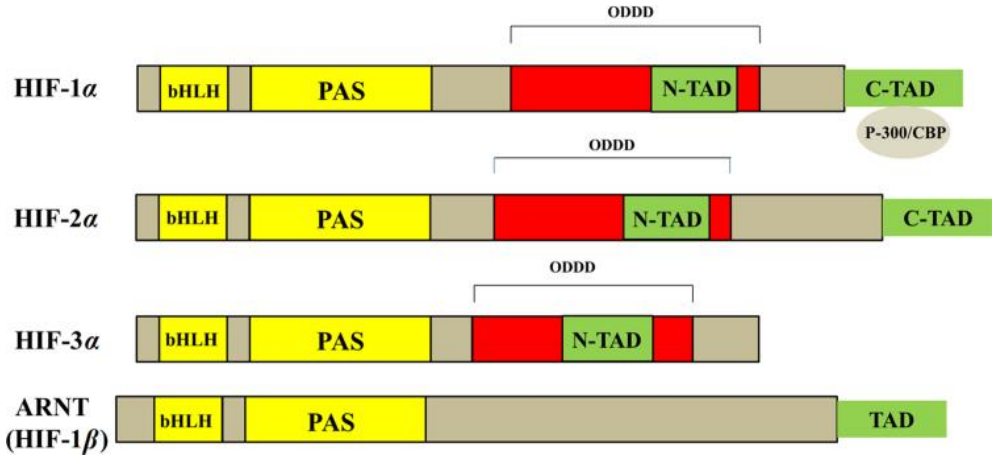


Figure I5 : Organisation structurelle des protéines de la famille HIF. Ces protéines sont composées de domaines bHLH et PAS permettant l'hétérodimérisation et la liaison à l'ADN, des domaines de transactivation TAD permettant l'interaction de HIF avec des coactivateurs transcriptionnels tels que p300 et CBP, d'un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène ODD et d'un domaine inhibiteur ID. (Masoud and Li 2015)

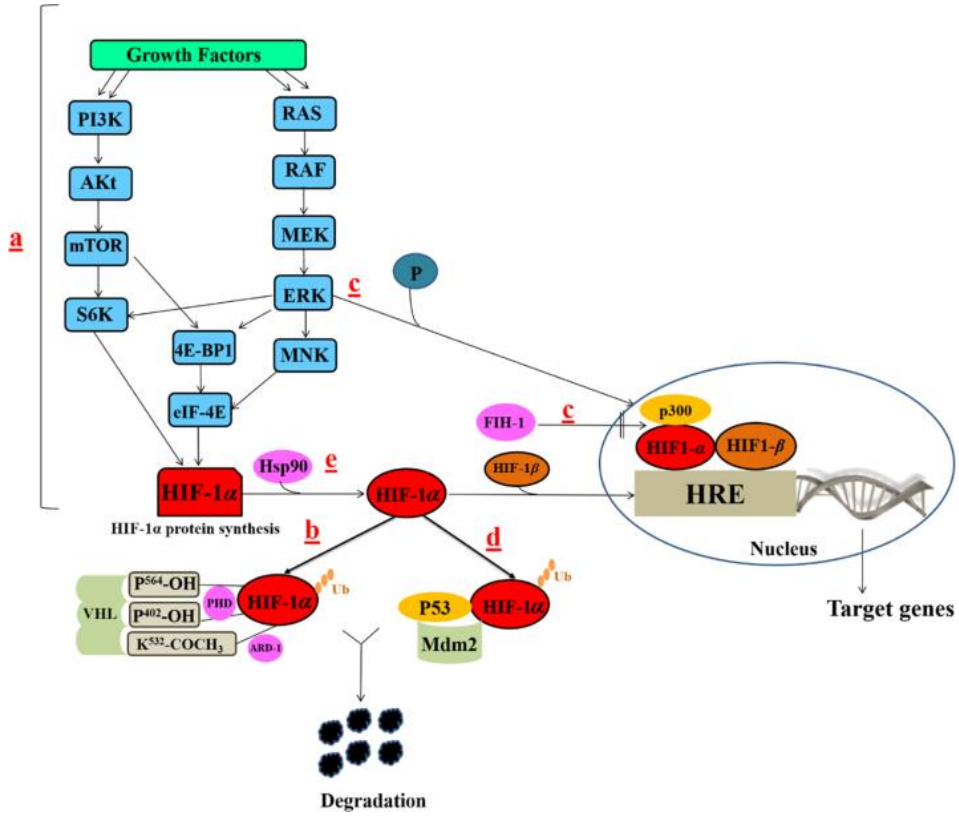


Figure I6 : Régulation de la protéine HIF-1. La protéine HIF-1 peut être régulée par (a) des facteurs de croissance, (b) la protéine pVHL, (c) la protéine inhibitrice FIH-1, (d) ubiquitination via la voie de signalisation Mdm2-p53 et (e) la protéine HSP90. L'ensemble de ces voies régule l'activité de HIF-1 par son niveau d'expression (a), sa stabilité (b, d et e) ou son activation (c et e). (Masoud and Li 2015)

2. HIF-1

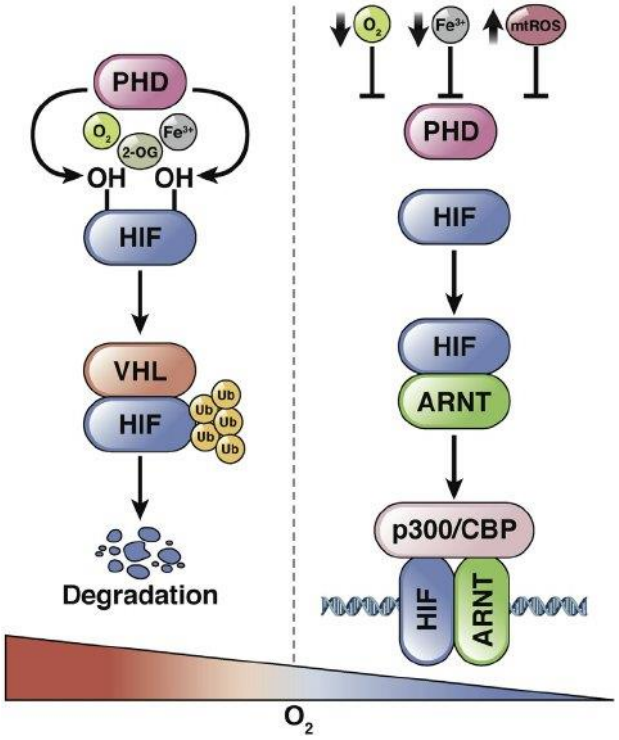
HIF-1 est un facteur de transcription décrit pour la première fois par Semenza et al en 1992 (Semenza and Wang 1992). En effet, ils ont découvert que HIF-1 se liait sur une séquence consensus au niveau d'un enhancer du gène codant pour l'érythropoïétine (EPO) lorsque des cellules d'hépatocarcinome (Hep3B) étaient incubées en hypoxie. Cette découverte est liée à l'identification d'une séquence consensus 5′-RCGTG-3′ appelée HRE (Hypoxia Response Element) présente dans la région 3' enhancer du gène codant pour l'EPO (Goldberg, Dunning et al. 1988). Par la suite, d'autres études ont révélé que HIF-1 était un hétérodimère constitué de deux sous unités, HIF-1α et HIF-1β, également appelée ARNT pour aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. Il existe deux homologues à HIF-1 : HIF-2 et HIF-3. Ces protéines appartiennent à la famille des bHLH-PAS (Basic Helix-Loop-Helix– Per-ARNT-Sim). Le nom bHLH-PAS fait référence aux domaines bHLH et PAS qui permettent aux sous-unités α et β d'interagir entre elles (Figure I5) (Ke and Costa 2006).

La structure d'HIF-1α se compose de différents domaines : deux domaines permettant l'hétérodimérisation et la liaison à l'ADN (bHLH et PAS), deux domaines de transactivation (TAD) permettant l'interaction de HIF avec des coactivateurs transcriptionnels, d'un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) et d'un domaine inhibiteur (ID) (figure I5) (Prabhakar and Semenza 2012, Masoud and Li 2015). L'expression de HIF-1α est induite par l'hypoxie de manière ubiquiste dans l'ensemble des tissus alors que HIF-2α est exprimé uniquement dans des tissus spécifiques comme dans les vaisseaux sanguins et les poumons (Prabhakar and Semenza 2012). HIF-1β, quant à lui, est exprimé de manière constitutive dans le noyau. Il possède les domaines bHLH et PAS mais aucun domaine de transactivation (Schofield and Ratcliffe 2004).

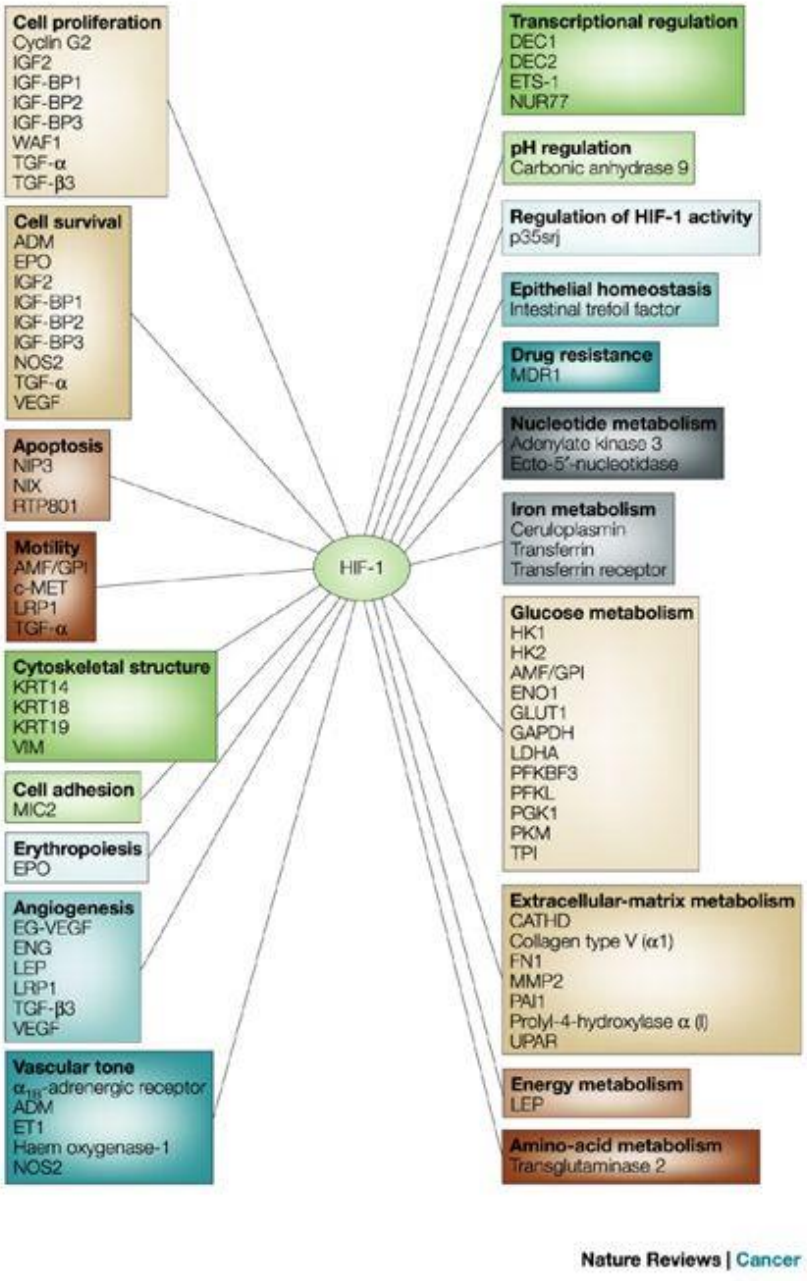
3. Régulation de HIF-1

L'accumulation et l'activation de la protéine HIF-1α sont minutieusement régulées au sein des cellules. Indépendamment du niveau d'oxygène, HIF-1α est constitutivement transcrit et synthétisé de façon régulée par diverses voies de signalisation et facteurs de croissance repris dans la figure I6 (Masoud and Li 2015). Cependant, en condition de normoxie, HIF-1α est rapidement dégradé (temps de demi-vie d'environ 5 minutes) (Salceda and Caro 1997) via des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination.

En normoxie, HIF-1α est poly ubiquitinylée et ciblée pour la dégradation par le protéasome par les prolyl-hydroxylases (PHD). Les PHD, appelées senseurs d'O_2, sont les régulateurs principaux de HIF-1α en induisant sa dégradation par le protéasome (Figure I7) (Appelhoff, Tian et al. 2004). Il existe trois isoformes de cette enzyme : PHD 1, 2 et 3.



<u>Figure I7</u> : Régulation de la stabilité de la protéine HIF-1α dépendante de l'oxygène. La sous-unité HIF-1α est hydroxylée au niveau de 2 résidus prolines par les enzymes PHD. Cette réaction nécessite de l'oxygène, du fer et de l'oxoglutarate. Après hydroxylation, la protéine pVHL se fixe à la protéine HIF-1α entrainant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En absence d'oxygène, cette réaction n'a plus lieu et la sous unité HIF-1α est stabilisée, transloquée au noyau où elle pourra former un facteur de transcription actif avec HIF-1β (ARNT) et ses coactivateurs (p300 et CBP). (Shah and Xie 2014)



<u>Figure I8</u> : Les gènes cibles de HIF-1. (Semenza 2003)

Berra et al ont montré en 2003 que la régulation de HIF-1α en condition de normoxie dépendait principalement de l'isoforme PHD2 (Berra, Benizri et al. 2003). Les protéines PHDs font partie de la famille des dioxygénases dépendant du 2-oxoglutarate et nécessitent l'oxygène, le fer et l'ascorbate pour exercer leur activité (Fong and Takeda 2008). Une fois liée à ses cofacteurs, la protéine PHD utilise l'oxygène comme substrat pour former des résidus 4-hydroxyprolines sur les prolines 402 et 564 du domaine ODD de HIF-1α. L'hydroxylation des résidus proline de HIF-1α permet alors la liaison de la protéine pVHL (von Hippel-Lindeau) (Mole, Maxwell et al. 2001). pVHL fait partie d'un complexe E3 ubiquitine ligase comprenant les élongines 2 et 3, la culline 2 ainsi que RBX1 (RING box protein 1). L'hydroxylation des résidus prolines par les PHDs déclenche la liaison et l'ubiquitination de HIF-1α par pVHL, menant à sa dégradation par le protéasome (figure I7).

En condition d'hypoxie, les PHDs sont inactives car leur cofacteur, l'O_2, n'est plus disponible entrainant la stabilisation et l'accumulation de HIF-1α qui est alors transloqué dans le noyau où il se lie à HIF-1β et forme le facteur de transcription HIF-1 fonctionnel par dimérisation grâce aux domaines bHLH et PAS. Une fois lié à la séquence HRE de l'ADN, ce complexe doit interagir avec un des deux cofacteurs transcriptionnels essentiels pour pouvoir induire l'expression de ses gènes cibles : p300 et CBP (Creb binding protein). La liaison de ce complexe aux séquences HRE entraine la transcription d'un large panel de gènes requis pour l'adaptation de la cellule à l'hypoxie (Ke and Costa 2006, Schodel, Grampp et al. 2016) (Figure I7).

L'activité de HIF-1 peut également être régulée par FIH-1 (Factor inhibiting HIF), inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Mahon, Hirota et al. 2001). FIH-1 ajoute un groupement hydroxyle sur un résidu asparagine, ASN 803, localisé au niveau du domaine TAD situé à l'extrémité C-terminale de HIF-1α empêchant la liaison du cofacteur p300 ou CBP et ainsi la transcription des gènes cibles de HIF-1 (Schofield and Ratcliffe 2004). De plus, la stabilisation et/ou la synthèse de HIF-1α en hypoxie pourrait être dépendante de l'activation des voies PI3K/Akt et des MAPKs (mitogen-activated protein kinases) (Michiels 2004, Masoud and Li 2015).

4. Cibles de HIF

L'hypoxie présente dans les tumeurs solides favorise la progression tumorale et la résistance à la radio- et à la chimiothérapie. Les mécanismes sous-jacents commencent à être élucidés grâce à l'étude des différents gènes cibles de HIF-1. Plus de 100 gènes cibles putatifs de HIF-1 ont été recensés. Ces gènes cibles codent pour des protéines impliquées dans des processus essentiels à l'adaptation des cellules aux conditions hypoxiques tels que l'angiogenèse, le passage à un métabolisme anaérobie et le transport de l'oxygène (figure I8). En effet, HIF-1

Tumor type	HIF-1	HIF-2	HIF and poor prognosis
Bladder	+	+	HIF-1
Breast	+	+	HIF-1
Colorectal	+	+	HIF-1 and HIF-2
Cervical	+	ND	HIF-1
Gastric	+	ND	HIF-1
Glial	+	+	HIF-1
Head and neck	+	+	HIF-1 and HIF-2
Hepatocellular	+	+	HIF-2
Lung NSCLC	+	+	HIF-2
Melanoma	+	+	HIF-2
Nasopharyngeal	+	+	HIF-1
Osteosarcoma	+	+	HIF-1
Ovarian	+	+	HIF-1 and HIF-2
Pancreatic	+	+	HIF-1
Prostate	+	+	ND
Renal	+	+	HIF-1 positive

Figure I9 : Activation de HIF-1 et HIF-2 dans différents types de cancer. L'expression de HIF-1 et HIF-2 a été détectée par immuno-histochimie. + : expression détectée ; - : expression non détectée ; NSCLC : non-small-cell lung cancer. (Rankin and Giaccia 2008)

active la transcription de l'EPO afin de favoriser la production d'érythrocytes, mais permet aussi la promotion de l'angiogenèse par l'activation de la transcription du gène codant pour le VEGF (vascular endothelial growth factor). HIF-1 est capable également d'induire le switch métabolique par activation de la transcription des enzymes glycolytiques telles que PGK1 (phosphoglycérate kinase 1), PKM (pyruvate kinase M), PFK, l'aldolase A ou la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) (Semenza 2003, Michiels 2004).

5. *Hypoxie et cancer*

L'hypoxie est une caractéristique majeure des tumeurs solides. En effet, le taux de prolifération élevé des cellules cancéreuses couplé à une néovascularisation anarchique limite la diffusion de l'oxygène au sein de la tumeur. En 1999, Zhong et al ont analysé le niveau d'expression de HIF-1 pour différent cancer et tissus sain. Il a été montré que 88% des tissus non cancéreux ne montraient aucune expression de HIF-1 alors que 53% des tissus tumoraux étudiés surexprimaient cette protéine (Zhong, De Marzo et al. 1999). La présence de ce facteur de transcription semble être essentielle à la progression tumorale puisque lorsqu'il est inactivé de façon expérimentale dans de nombreux cancers, la croissance tumorale, la vascularisation et le nombre de métastases diminuent en comparaison aux tumeurs contrôles (Semenza 2010). De plus, pour de nombreux cancers, un niveau d'expression élevé de HIF-1α et/ou HIF-2α a été corrélé à un mauvais pronostic (figure I9) (Rankin and Giaccia 2008). L'implication de cette protéine dans la progression tumorale a été longuement étudiée. HIF-1 promeut le développement tumoral par différentes voies : augmentation de l'angiogenèse, modification de la transition épithélio-mésenchymateuse, régulation du pH, augmentation du potentiel invasif, régulation du switch métabolique, instabilité génomique et résistance aux traitements (Semenza 2012).

De nombreux gènes cibles de HIF-1 permettant l'adaptation du microenvironnement à l'hypoxie, y compris ceux cités précédemment, favorisent la progression tumorale vers un phénotype agressif et induisent une résistance aux agents chimiothérapeutiques (Cosse and Michiels 2008). Comme décrit précédemment, la transition épithélio-mésenchymateuse est un facteur clé lors de la progression cancéreuse. La régulation de l'EMT est primordiale afin d'empêcher les métastases cancéreuses. L'E-cadhérine est une molécule d'adhérence qui joue un rôle dans la régulation de la formation de métastases. De nombreux facteurs de transcription sont capables de réprimer l'expression de l'E-cadhérine, c'est le cas de TWIST (Twist-related protein), favorisant alors la formation de métastases. En condition d'hypoxie, TWIST est surexprimé grâce au facteur de transcription HIF-1, ce qui conduit à une diminution de l'abondance de l'E-cadhérine et *in fine* à la formation de métastases (Beavon 1999, Chen, Chen et al. 2016).

En condition d'hypoxie, les cellules cancéreuses utilisent la glycolyse plutôt que la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP, entrainant ainsi une acidification de l'environnement tumoral. Pour empêcher ce phénomène, HIF-1 active la transcription de CAIX (l'anhydrase carbonique IX). Cette enzyme catalyse la réaction du dioxyde de carbone plus de l'eau en proton et HCO_3^- exportables hors de la cellule permettant de maintenir un pH intracellulaire optimal (Pastorekova, Zatovicova et al. 2008). Il a été également démontré, dans le cancer du sein, qu'une diminution de l'expression de CAIX diminuait la croissance tumorale. Cette étude souligne donc l'importance de la régulation du pH au sein d'une tumeur, mais également son rôle dans la progression tumorale (Robertson, Potter et al. 2004).

L'hypoxie peut également avoir un impact direct sur des processus biologiques indépendamment de HIF-1. En effet, comme cité précédemment, l'hypoxie active la voie UPR et favorise ainsi la survie et la croissance cellulaire. Au sein du réticulum endoplasmique (RE), les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que des liaisons disulfures. Ces modifications sont catalysées par des disulfures isomérases dont l'activité est dépendante du niveau d'oxygène. Ainsi l'hypoxie peut conduire à l'accumulation de protéines mal repliées au sein du RE et à une activation de l'UPR. Cette accumulation de protéines peut également être causée par la privation de glucose souvent associée à l'hypoxie. L'activation de l'UPR entraine alors l'activation de facteurs de transcription et la synthèse de protéines afin de répondre au stress que représente l'hypoxie. Ces effets directs de l'hypoxie sur l'UPR favorisent la survie des cellules cancéreuses (Wouters and Koritzinsky 2008, Wang and Kaufman 2014).

6. Hypoxie et résistance aux traitements

En plus de favoriser la progression de la tumeur, l'hypoxie peut également provoquer une résistance aux agents chimiothérapeutiques. En effet, la structure anarchique et anormale de la vascularisation tumorale entraine une distribution inégale de l'agent chimiothérapeutique au sein de la tumeur avec dans les zones hypoxiques une diminution d'agent chimiothérapeutique en comparaison aux cellules proches des vaisseaux. De plus, certains traitements nécessitent de l'oxygène pour agir. C'est le cas de la doxorubicine qui utilise l'oxygène pour former un anion superoxyde devenant cytotoxique pour la cellule. En hypoxie, l'anion superoxyde n'est pas formé, limitant ainsi l'action de la doxorubicine (Tredan, Galmarini et al. 2007).

Le facteur de transcription HIF-1 peut également entrainer une chimiorésistance via la surexpression de certains de ses gènes cibles. Parmi ces gènes, *MDR-1* et *MRP1* codent pour des protéines qui permettent d'exporter les drogues en dehors de la cellule (Zhu, Chen et al. 2005) lui conférant alors une résistance aux agents anti-cancéreux. HIF-1 peut également conférer la résistance aux agents chimiothérapeutiques par la modulation de l'expression de

protéines impliquées dans l'apoptose. Flamant et al ont montré en 2010 que l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que *Bak* et les *caspase 3, 8* et *10* était diminuée par HIF-1 en hypoxie. D'autres études ont également montré que HIF-1 peut réguler l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que *Bax* et *Bid* et induire la chimiorésistance (Erler, Cawthorne et al. 2004, Rebucci and Michiels 2013). En 2009, Arumugan et al ont mis en évidence une corrélation inverse entre le niveau d'expression de l'E-cadherine et de Zeb-1 et la résistance au cisplatine de cellules issues de cancer du pancréas (Arumugam, Ramachandran et al. 2009). De plus, une déplétion du gène TWIST et Snail, deux inducteurs de l'EMT, entraine une sensibilisation de cellules provenant de cancer du poumon et de cancer de la tête et du cou au cisplatine (Zhuo, Wang et al. 2008, Hsu, Lan et al. 2010). Depuis lors, de nombreuses études ont impliqué l'EMT dans la chimiorésistance.

Cependant, il reste encore beaucoup de questions quant au rôle de l'hypoxie dans la réponse aux traitements. Depuis quelques années, le professeur Carine Michiels et son équipe travaillent sur cette thématique de recherche. En 2008, Sermeus et al ont montré que l'hypoxie protégeait certaines lignées cellulaires cancéreuses de la mort induite par les agents chimiothérapeutiques. En effet, en condition d'hypoxie, les cellules dérivées d'hépatocarcinome (HepG2) sont protégées de la mort cellulaire induite par l'étoposide. De même, les cellules dérivées d'un carcinome du sein (MDA-MB-231) sont résistantes au taxol en hypoxie (Sermeus, Cosse et al. 2008). Comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance induite par l'hypoxie est primordial pour permettre l'amélioration des traitements anti-cancéreux.

Dans ce contexte de chimiorésistance induite par l'hypoxie, en 2012, Flamant et al ont réalisé une analyse transcriptomique afin d'étudier les gènes dont l'expression est modulée en hypoxie avec ou sans agent chimiothérapeutique. Cette étude a été réalisée sur les cellules MDA-MB-231 incubées en normoxie ou hypoxie en présence ou en absence de taxol. Leurs résultats ont montré que le gène dont l'expression est la plus fortement augmentée en hypoxie est le gène codant pour TMEM45A. Pour démontrer que l'expression de *TMEM45A* est dépendante du facteur de transcription HIF-1, Flamant et al ont ensuite invalidé l'expression de HIF-1α par siARN. En condition d'hypoxie, l'abondance de *TMEM45A* dans les cellules contrôles était très fortement augmentée par rapport aux cellules incubées en normoxie, tandis que l'expression de *TMEM45A* était fortement diminuée lorsque HIF-1α n'était plus présent que ce soit en normoxie ou en hypoxie. Cette expérience a permis de montrer que l'expression de *TMEM45A* est dépendante du facteur de transcription HIF-1 (Flamant, Roegiers et al. 2012).

En 2007, Martin-Rendon et al ont montré que la capacité clonogénique myéloïde des cellules du cordon ombilical CD133+ dans une atmosphère à 1,5 % d'oxygène était augmentée. Une analyse transcriptomique a été réalisée afin d'analyser la signature des gènes en hypoxie dans ce type cellulaire. Dans ces conditions, l'expression de *TMEM45A* était augmentée (Martin-Rendon, Hale et al. 2007). L'expression de *TMEM45A* induite par l'hypoxie a été démontrée

par des études supplémentaires. En 2014, Olbryt et al ont montré par analyses transcriptomiques que l'expression de *TMEM45A* est augmentée dans des cellules de mélanome, de cancer des ovaires et de cancer de la prostate lorsqu'elles sont incubées 72h en hypoxie chronique, mais également lorsque les cellules sont exposées à de l'hypoxie cyclique. Par ailleurs, la sévérité de l'hypoxie influence la régulation de l'expression de *TMEM45A* (Olbryt, Habryka et al. 2014). Des cellules de gliomes exposées à 3 % d'O_2 présentent une expression de *TMEM45A* augmentée comparée à la normoxie et cette augmentation est d'autant plus grande lorsque les cellules sont incubées en présence de 0,3 % d'O_2 (Nissou, El Atifi et al. 2013).

Par ailleurs, il est également possible d'augmenter le niveau d'expression de *TMEM45A* sans incuber les cellules en hypoxie. En effet, Radreau et al ont montré que des cellules épithéliales du cristallin exposées à la quercétine, une molécule flavonoïde, expriment 2 fois plus *TMEM45A* que les cellules contrôles. Ils ont démontré que la quercétine induit la stabilisation de HIF-1α, expliquant ainsi l'augmentation de l'abondance de *TMEM45A* (Radreau, Rhodes et al. 2009).

Lors de leur étude, Flamant et al ont également étudié l'implication éventuelle de la protéine TMEM45A dans la chimiorésistance conférée par l'hypoxie. Ils ont observé une restauration de la mort cellulaire induite par le taxol suite à l'invalidation de l'expression de *TMEM45A* dans des cellules MDA-MB-231 exposées à l'hypoxie. Pour confirmer le rôle de cette protéine dans la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques, l'expression de *TMEM45A* a été invalidée dans le second modèle, les cellules HepG2. Dans ces conditions, l'invalidation de l'expression de *TMEM45A* a démontré l'implication de cette protéine dans la protection induite par l'hypoxie suite à l'incubation des cellules en présence d'étoposide (Flamant, Roegiers et al. 2012).

Conclusion

Ce chapitre met en évidence l'implication du microenvironnement et plus particulièrement de l'hypoxie dans la résistance des cellules cancéreuses face aux chimiothérapies. Les études réalisées sur la protéine TMEM45A, protéine identifiée en condition d'hypoxie, ont permis de mettre en évidence un rôle de cette protéine dans la protection conférée par l'hypoxie contre la mort cellulaire induite par des agents thérapeutiques. Dès lors, il semble intéressant d'étudier plus en détail la protéine TMEM45A ainsi que son rôle dans l'apoptose et la chimiorésistance afin d'utiliser cette protéine comme marqueur potentiel dans le développement tumoral et la réponse aux traitements des cancers.

Chapitre 3 : Les protéines TMEM

1. La super-famille TMEM

La super-famille TMEM encode des protéines transmembranaires très peu caractérisées. Ces protéines sont localisées dans les membranes cellulaires telles que les membranes des mitochondries, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Wrzesinski, Szelag et al. 2015*).* Un grand nombre d'entre elles ont été impliquées dans le cancer comme décrit dans la revue ci-dessous.

frontiers in Pharmacology

REVIEW
published: 06 December 2018
doi: 10.3389/fphar.2018.01345

TMEM Proteins in Cancer: A Review

*Kathleen Schmit and Carine Michiels**

URBC-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium

A transmembrane protein (TMEM) is a type of protein that spans biological membranes. Many of them extend through the lipid bilayer of the plasma membrane but others are located to the membrane of organelles. The TMEM family gathers proteins of mostly unknown functions. Many studies showed that TMEM expression can be down- or up-regulated in tumor tissues compared to adjacent healthy tissues. Indeed, some TMEMs such as TMEM48 or TMEM97 are defined as potential prognostic biomarkers for lung cancer. Furthermore, experimental evidence suggests that TMEM proteins can be described as tumor suppressors or oncogenes. TMEMs, such as TMEM45A and TMEM205, have also been implicated in tumor progression and invasion but also in chemoresistance. Thus, a better characterization of these proteins could help to better understand their implication in cancer and to allow the development of improved therapy strategies in the future. This review gives an overview of the implication of TMEM proteins in cancer.

Keywords: cancer, TMEM proteins, biomarkers, tumor suppressors, oncogenes, chemoresistance

OPEN ACCESS

Edited by:
Agnès Noël,
Université de Liège, Belgium

Reviewed by:
Zhijie Xu,
Central South University, China
Karen Maegley,
Pfizer (United States), United States

****Correspondence:***
Carine Michiels
carine.michiels@unamur.be

Specialty section:
This article was submitted to Pharmacology of Anti-Cancer Drugs, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

Received: *17 June 2018*
Accepted: *31 October 2018*
Published: *06 December 2018*

Citation:
Schmit K and Michiels C (2018) TMEM Proteins in Cancer: A Review. Front. Pharmacol. 9:1345. doi: 10.3389/fphar.2018.01345

INTRODUCTION

A TMEM is a type of protein that spans the entire width of the lipid bilayer and to which it is permanently anchored. Many TMEMs function as channels to permit the transport of specific substances across the biological membranes. But the biological functions of many of them remain unknown mainly due to difficulties in the extraction and purification of these proteins. There are two ways to classify the TMEMs. The first one is according to their structure. Indeed there are two basic types of TMEMs, alpha-helical proteins and the beta-barrel proteins (Vinothkumar and Henderson, 2010). The second classification is according to their topology, this classification refers to the position of the N- and C-terminal domains (von Heijne, 2006).

Among TMEMs is the TMEM family. The proteins of this family are predicted to be components of various cell membranes, such as mitochondrial, endoplasmic reticulum, lysosome, and Golgi membranes. TMEMs are present in many cell types and fulfill important physiological functions such as epidermal keratinization (TMEM45A) (Hayez et al., 2014), autophagy, smooth muscle contraction (TMEM16) (Thomas-Gatewood et al., 2011), protein glycosylation (TMEM165) (Foulquier et al., 2012) and development and differentiation of the liver (TMEM97) (Malhotra et al., 1999). Among them, some members play a primordial

Abbreviations: BRCA1, breast cancer type 1 susceptibility protein; CDK, cyclin-dependent kinase; DVL1, disheveled 1; EMT, epithelial–mesenchymal transition; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GSKβ, glycogen synthase kinase 3β; HDAC, histone deacetylase; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; HPDE, normal pancreatic ductal epithelium; ICAM, intercellular adhesion molecule 1; IFN, interferon; IL, interleukin; MAC30, meningioma-associated protein; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; MMP, matrix metalloproteinase; mRNA, messenger ribonucleic acid; NDC1, transmembrane Nucleoporin; NSCLC, non-small cell lung cancer; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RAB8, Ras-related protein; SQCLC, squamous cell lung carcinoma; STXR6, syntaxin 6; TLR, toll-like receptor; TGF-β, transforming growth factor-β; TNF, tumor necrosis factor; TMEM, transmembrane protein; UTR, untranslated region; VCAM, vascular cell adhesion molecule 1; ZO-1, zona occludens 1.

role in immune response (TMEM9B) (Dodeller et al., 2008). Indeed, TMEM9B is a key component of inflammatory signaling pathways through the enhancement of the production of pro-inflammatory cytokines induced by TNF, IL1β, and TLR ligands.

In many cancers, differential regulation of the expression of TMEMs has been observed, such as in lymphomas (TMEM176) (Cuajungco et al., 2012), colorectal cancer (TMEM25) (Hrasovec et al., 2013), hepatic cancer (TMEM7) (Zhou et al., 2007), and lung cancer (TMEM48) (Qiao et al., 2016). Some of them are used as prognostic biomarkers. For example, in renal cancers, many TMEMs with predicted ER localization have been shown to be potential classifiers of cancer grade (e.g., TMEM45A, TMEM116, TMEM207, TMEM213. . .) (Wrzesinski et al., 2015). A large number of TMEMs have also been implicated in cancer development and in drug resistance, suggesting that the TMEM family is a prominent group for cancer research. Furthermore, some of these proteins act as tumor suppressors (e.g., TMEM25, TMEM7) (Zhou et al., 2007; Doolan et al., 2009) while others act as pro-oncogenes (e.g., TMEM158, TMEM14A. . .) (Cheng et al., 2015; Zhang et al., 2016). This review aims to describe the implication of the TMEM proteins in cancer.

PART 1: TMEMs AS TUMOR SUPPRESSORS

Some TMEMs have been described in the literature to act as tumor suppressors. A downregulation of their expression is generally observed in tumor tissue compared to adjacent healthy tissue. It is for example the case for TMEM25. This protein is a member of the immunoglobulin super-family and is involved in immune response, growth factor signaling and cell adhesion (Katoh and Katoh, 2004). The expression of this protein has been studied in fresh tumor samples collected during surgical colectomy from patients who had been diagnosed with primary colorectal adenocarcinoma. TMEM25 mRNA expression was significantly decreased in 68% of tumor tissues in comparison to corresponding normal tissues. This downregulation has been correlated with the hypermethylation of a specific CpG site in the 5′ UTR region of TMEM25 gene in a high proportion of tumor samples (Hrasovec et al., 2013). Another study revealed that TMEM25 expression in the tumor tissues was lower than the one in normal healthy tissues in 50% of tumor samples in human breast tumor biopsies. The expression of TMEM25 was correlated with a better overall survival and associated with a longer survival time for patients who received adjuvant chemotherapy. Furthermore, in triple-negative breast tumors, TMEM25 was generally not expressed (Doolan et al., 2009). All together these findings suggest that TMEM25 may be used as a tumor biomarker of favorable prognosis.

Another example is TMEM7. This protein of 232 amino acids has a single transmembrane domain and is expressed in the liver. The gene coding for TMEM7 is localized in the short arm of chromosome 3, which is commonly deleted in cancer cells (Huebner, 2001). Chromosomal regions that are deleted in cancer are generally the loci of tumor suppressor genes, suggesting that TMEM7 is a candidate suppressor gene. This protein has been studied in 18 hepatocellular carcinoma cell lines but also in primary tumors obtained from surgical resection of hepatocellular carcinoma from 17 patients. Each tumor sample was matched with its corresponding healthy liver tissue. In the absence of homozygous deletion, TMEM7 is down regulated in 33% of the cell lines and 85% of the tumor samples compared to healthy tissue. Tumor suppressor genes located at chromosomal regions deleted in some cancer cells are found to be silenced by promoter methylation in other cell lines. In two lines of the latter that displayed TMEM7 downregulation, 5-aza-2′-deoxycytidine, a DNA methylation inhibitor and trichostatin A, a HDAC inhibitor, increased TMEM7 expression suggesting that aberrant methylation and histone deacetylation are responsible for the transcriptional silencing of this gene. The study of this protein also showed that INF-α induced TMEM7 mRNA expression and the restoration of its expression by overexpression or by induction with IFN-α decreased the proliferation and the invasion of hepatocellular carcinoma cell lines (SNU398 and PLC/PRF/5 or HLF and MHCC97 respectively). These data have also been validated *in vivo*. Indeed, ectopic expression of TMEM7 in two TMEM7 deficient hepatocarcinoma cell lines decreased tumor growth in nude mice (Zhou et al., 2007). All these data highlight the tumor suppressor role of TMEM7 in hepatocellular carcinoma.

Two recent studies also showed that TMEM176A could act as tumor suppressor. The first one was performed in esophageal squamous cell carcinoma. Wang et al. analyzed the methylation profile of TMEM176A promoter in 13 cell lines (BIC1, TE1, TE3, TE13, KYSE140, KYSE180, KYSE410, KYSE450, KYSE520, Segl, KYSE150, YES2, and COLO680N) and 267 primary esophageal squamous cell carcinoma. The results showed the loss of TMEM176 expression in 12 cell lines (TE1, TE3, TE13, KYSE140, KYSE180, KYSE410, KYSE450, KYSE520, Segl, KYSE150, YES2, and COLO680N) in association with a complete methylation of its promoter. It also revealed that 66% of primary tumors presented TMEM176A promoter methylation. This methylation and TMEM176A decreased expression were correlated with poor overall survival. The restoration in two cell lines, KYSE410 and KYSE150, of TMEM176A expression with 5′-aza-2′-deoxycytidine treatment and the downregulation of TMEM176A in BIC1 cells showed that TMEM176A inhibited cell invasion and migration and induced apoptosis. Furthermore, TMEM176A inhibited cell growth both *in vitro* and *in vivo* with a decrease in tumor volume when TMEM176A was re-expressed (Wang et al., 2017). A very similar study has been performed in colorectal cancer. It revealed that 50% of the primary tumors presented methylation of TMEM176 promoter. The results also showed a normal expression of TMEM176A in LS180 and SW620 cell lines, a decreased expression in HT29 and SW480 cell lines and a total loss of expression in LOVO, HCT116, RKO, and DLD1 cell lines respectively associated with no methylation, partial methylation and total methylation of TMEM176A promoter. In colorectal cancer as well as in esophageal squamous cell carcinoma, TMEM176A overexpression inhibited cell migration and invasion, induced apoptosis and inhibited cell growth both *in vitro* and *in vivo* (Gao et al., 2017). These two studies together presented TMEM176A

as tumor suppressor of esophageal squamous cell carcinoma and colorectal cancer.

The last protein described in this part is TMEM97. This protein, also named MAC30, is a member of the insulin-like growth factor binding proteins (Murphy et al., 1993). TMEM97 mRNA is expressed in the fetal liver but not in adult liver suggesting a role in development and differentiation of the liver (Malhotra et al., 1999). In 2001 and 2002, two studies showed that the expression of TMEM97 can be induced by other genes like BRCA1 but also be downregulated by others like p53 suggesting that the expression of this gene can be deregulated in cancers (Kannan et al., 2001; Atalay et al., 2002). Indeed, the expression of TMEM97 is increased in several types of cancer as described later in this review, except in pancreatic and renal cancers that both display a low expression level of TMEM97 protein and mRNA. In 2004, 30 pancreatic cancer tissues obtained from patients after tumor resection and 19 non-cancerous pancreatic tissues obtained through an organ donor program have been used to analyze the expression level of TMEM97 in pancreatic cancer both at the mRNA level by RT-qPCR and at the protein level by histochemistry. 50% of pancreatic cancer biopsies displayed a lower TMEM97 mRNA expression compared to normal pancreatic tissue, 20% displayed no change and 30% presented higher TMEM97 mRNA levels. These results highlighted a high variability regarding TMEM97 expression levels in pancreatic cancer. A high variation in mRNA level expression was also observed in different pancreatic cancer cell lines (Aspc-1, BxPc-3, Capan-1, Colo-357, T3M4, Mia-PaCa-2 and Panc-1 cells). The protein expression and localization of TMEM97 were also analyzed: TMEM97 protein was strongly expression in the cytoplasm of islet cells and moderately in acinar cells. Cancer cells in pancreatic cancer tissues displayed weak or no expression of this protein in more than 75% of cases. But at low levels in pancreatic cancer cells (Aspc-1, BxPc-3, Capan-1, Colo-357, T3M4, Mia-PaCa-2 and Panc-1 cells). Knowing that tubular complexes are considered as potential pre-neoplastic lesions, The observed reduction of TMEM97 expression in pancreatic cancer suggests that this gene might act as a tumor suppressor in this disease (Kayed et al., 2004). This hypothesis may also be true for prostate cancer since miR-152-3p downregulation and promoter methylation were found to be prevalent in primary prostate cancers. TMEM97, which is overexpressed in this type of cancer, is a target of miR-152-3p (Ramalho-Carvalho et al., 2018).

PART 2: TMEMs AS ONCOGENES

Many TMEMs are up regulated in cancer. Some of them are implicated in tumor progression, invasion and in the formation of metastasis while others are associated with poor prognosis and can be used as prognostic biomarker. The studies behind these conclusions are summarized here under.

TMEMs as Prognostic Biomarkers

TMEM48, also named NDC1 is localized to the nuclear pore complexes. This nucleoporin has six membrane-spanning segments and is crucial for nuclear pore complexes and nuclear envelope assembly (Stavru et al., 2006). The integrity of the nuclear envelope and a correct nucleocytoplasmic transport are important for many cellular processes such as genome stability, DNA replication, or DNA repair (D'Angelo and Hetzer, 2008). Nucleoporin deregulation has been implicated in several malignancies such as breast cancers (Agudo et al., 2004; Kau et al., 2004) in multiple tumors including melanoma, pancreatic, colon, gastric, prostate, esophageal, lung cancer, and lymphomas (Mahipal and Malafa, 2016). A study based on 60 patients with NSCLC showed that TMEM48 expression was significantly higher in cancer tissues compared to healthy tissues. This overexpression was associated with poor prognosis, lymph node metastasis, increased tumor size and short survival (Qiao et al., 2016). All together these results suggest that, since TMEM48 mRNA expression is increased in non-small lung carcinoma in association with advanced tumor stage, TMEM48 may be a potential prognostic factor for NSCLC.

TMEM45A is a TMEM of 275 amino acids, predicted to have five to seven transmembrane domains and localized in the trans Golgi apparatus. Very little is known about this protein except that TMEM45A is highly expressed in the skin and is associated with epiderm keratinization (Hayez et al., 2014). This protein is overexpressed in many cancers: breast cancer, liver cancer, renal cancer, glioma, head and neck cancer, ductal cancer, and ovarian cancer (Flamant et al., 2012; Lee et al., 2012; Guo et al., 2015; Sun et al., 2015; Wrzesinski et al., 2015; Manawapat-Klopfer et al., 2016). In the cases of breast cancer and cervical lesions, a higher expression level of TMEM45A has been correlated with a lower patient overall survival suggesting that TMEM45A is a potential biomarker for aggressiveness of breast cancer and cervical lesions (Flamant et al., 2012; Manawapat-Klopfer et al., 2016).

Despite the putative tumor suppressor role of TMEM97 in pancreatic and prostate cancers, this protein is overexpressed in different types of cancer and associated with tumor progression, recurrence and poor survival. It is the case in breast, gastric, colon, epithelial ovarian, oral squamous, and NSCLC. Indeed, the expression of TMEM97 has been analyzed in 20 cases of NSCLC compared to adjacent healthy tissue: 65% of patients showed a higher expression level of TMEM97 in tumor tissue compared to healthy tissue. Furthermore, the expression of this protein has been correlated with poor tumor differentiation and a shorter patient survival (Han et al., 2013). A similar study performed in human SQCLC showed TMEM97 overexpression in 26 of the 32 tumor samples in comparison to corresponding non-tumor tissues. TMEM97 overexpression was associated with poor tumor differentiation and shorter overall patient survival (Ding et al., 2016). Another study in breast cancer revealed that 59.7% of tumor samples displayed a higher expression level of TMEM97 compared to healthy tissue and that this overexpression correlated with larger tumor size and tumor recurrences. One study on ovarian cancer showed that high expression of TMEM97 was correlated with high histological grade and tumor recurrence (Xiao et al., 2013; Yang et al., 2013). All these studies demonstrated that TMEM97 expression could affect the prognosis of NSCLC, SQCLC, ovarian and breast cancer patients.

Another important TMEM protein is TMEM16A. TMEM16A, also known as anoctamin-1, is expressed in cerebral artery smooth muscle cells and is predicted to have eight transmembrane domains. This protein is a TMEM that functions as a calcium-activated Cl- channel (Thomas-Gatewood et al., 2011). TMEM16A has recently been shown to be upregulated in several cancers including HNSCC, esophageal, breast and gastric cancers. In HNSCC, the expression of TMEM16A has been studied by fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry on several primary tumors. The results demonstrated that TMEM16A was highly expressed in 4–19% of the samples and that higher TMEM16A expression strongly correlated with poor prognosis of HNSCC patients (Ruiz et al., 2012). In another study in HNSCC, TMEM16A has been shown to be overexpressed in 84% of tumor samples (Carles et al., 2006). In the context of gastric cancer, the expression of TMEM16A has been evidenced to be higher in tumor tissue than in adjacent non-tumor tissue. Furthermore, the expression of this protein has been correlated with the tumor stage and negatively correlated with patient survival in this cancer type (Liu et al., 2015). TMEM16A is thus proposed to be a negative prognostic factor.

Two other TMEMs have been described as prognosis biomarker. In glioma, TMEM140 expression has been analyzed in 47 of the 70 glioma samples by immunohistochemistry. The results showed a higher expression in tumor tissue than in the control brain tissue and a correlation with poor prognosis in this cancer (Li et al., 2015a,b). In lung cancer, TMEM45B expression has been analyzed in 110 tumor tissue samples and 35 non-tumor tissue samples. TMEM45B was shown to be upregulated in lung cancer and its expression was negatively correlated with overall survival (Hu et al., 2016).

TMEMs Involved in Tumor Growth

Besides the evidence for a correlation between TMEM expression and patient survival, some of these proteins have been shown to be directly involved in tumor growth but the mechanisms by which they act are not always known.

With an Identified Pathway

The first protein described in this part is TMEM158, also called Ras-induced senescence 1 protein (RIS1). The gene coding for this protein is known to be upregulated during Ras-induced senescence in human diploid fibroblasts infected with rasV12-containing retrovirus (Barradas et al., 2002). TMEM158 is overexpressed in Wilms tumors (also known as nephroblastoma) with somatic mutations in catenin beta-1 gene suggesting a relationship between the Ras and Wnt signaling pathways (Zirn et al., 2006). TMEM158 is also overexpressed in ovarian cancer in 84% of the 25 tumor samples which were analyzed. The involvement of TMEM158 in tumor growth has been studied in two ovarian cancer cell lines, HO-8910 and A2780. This protein was evidenced to regulate cell proliferation, adhesion, and invasion. Furthermore, TMEM158 knockdown inhibited tumor growth of HO-8910 cell line in nude mice highlighting the role of this protein in tumorigenicity. TMEM158 silencing led to the deregulation of the expression of different genes, including a downregulation of ICAM1 and VCAM1 expression. These two proteins are involved in cell adhesion. TMEM158 silencing also impaired the TGF-β signaling pathway (Cheng et al., 2015). All these results showed that TMEM158 may work as an oncogene in ovarian cancer.

The implication of TMEM48 in NSCLC progression has been studied in two cell lines that overexpressed this protein, A549 and H1299. The results suggested a role of TMEM48 in cell proliferation, migration and invasion. Indeed, the silencing of this gene impaired cell proliferation, induced cell cycle arrest and decreased the migration and invasive ability of NSCLC cells. The downregulation of TMEM48 also induced cell apoptosis in association with a decrease or an increase in anti- or pro-apoptotic gene expression respectively. One of these two cell lines (A549) was also used to study the involvement of TMEM48 in tumorigenicity *in vivo* and the data revealed that TMEM48 is involved in tumor formation from A549 cells in nude mice. A marked decrease in tumor weight (50%) was evidenced when TMEM48 was silenced. All these evidences showed a role of TMEM48 in lung cancer progression (Qiao et al., 2016). A recent study demonstrated that TMEM48 suppression by miR-421 increased the expression of the apoptotic and tumor suppressor proteins caspase 3, PTEN and p53 in A549 cells (Akkafa et al., 2018). These results suggest that TMEM48 modulates the apoptotic pathway.

TMEM14A is a TMEM with three transmembrane domains, localized in mitochondria. This protein is deregulated in different types of cancer such as ovarian cancer, colon cancer and hepatocellular carcinoma (Hodo et al., 2010; Smith et al., 2010; Zhang et al., 2016). In the context of ovarian cancer, TMEM14A is involved in cell proliferation as shown by a cell cycle arrest when TMEM14A was invalidated in two ovarian cancer cell lines, A2780 and HO-8910. TMEM14A up regulation also increased the cell invasive ability of ovarian cancer cells highlighting a potential role of this protein to promote metastasis. Further investigations showed that TMEM14A knockdown may down-regulate the protein expression of PCNA, cyclins and MMPs. It may also downregulate TGF-β signaling (Zhang et al., 2016). These results could explain the decrease in cell proliferation and invasiveness in ovarian cancer cell lines when TMEM14A was invalidated.

TMEM97 is found deregulated in several types of cancer but this protein has been particularly involved in the tumor growth of two cancers: glioma and gastric cancer. Indeed, the silencing of TMEM97 expression in glioma U373 and U87 cells inhibited cell proliferation and cell cycle progression associated with a decrease in cyclin B1, E, CDK2 and CDK4 expression, but also in cell invasiveness. TMEM97 silencing also induced the deregulation of the expression of EMT markers like β-catenin, Twist and E-cadherin (Qiu et al., 2015). The downregulation of TMEM97 in gastric cancer BGC-823 and AGS cell lines inhibited the cell proliferation and mobility with a decrease in Akt phosphorylation, hence suggesting that Akt may mediate the TMEM97-induced inhibition of proliferation (Xu et al., 2014). The invalidation of TMEM97 also induced an inhibition of cell migration and invasion by reducing the expression of cyclin B1 and WAVE2. These data showed that TMEM97 plays an

important role in tumor growth and aggressiveness in glioma and gastric cancer.

Another TMEM protein involved in tumor growth is TMEM16A. In human colorectal cancer cells, the mRNA and protein expression of TMEM16A has been reported in several cell lines like SW620, HCT116 and LS174T but not in HCT8 and SW480. TMEM16A knockdown in SW620 cell line inhibited cell proliferation, migration and invasion. These effects were mediated through a decrease in the expression of cyclin D1 and in the phosphorylation of MEK and ERK1/2. Furthermore, invalidation of TMEM16A expression led to a delay in cell cycle progression (Sui et al., 2014). TMEM16A expression is also regulated epigenetically. Indeed, inhibition of HDAC class I and II by siRNA or pharmacological agents decreased the expression of TMEM16A. HDAC3 seems to be the most important one in this regard. Hence, the inhibition of HDAC3 may exert suppressive effect on cancer cell viability via the downregulation of TMEM16A in prostate or breast cancer (Matsuba et al., 2014). TMEM16A has also been well-studied in gastric cancer. Knockdown in AGS and BGC-823 gastric cancer cell lines inhibited cell migration and invasion via a downregulation of E-cadherin expression (EMT marker) probably via a decrease in TGF-β secretion since the supplementation of exogenous TGF-β restored E-cadherin expression and cell migration and invasion (Liu et al., 2015). TMEM16A silencing was also shown to induce apoptosis in human prostate cancer PC3 cells by upregulating TGF-β signaling (Song et al., 2018). In pancreatic ductal adenocarcinoma, TMEM16A is overexpressed in several cancer cell lines (Mia PaCa-2, Panc-1, BxPC-3, and AsPC-1) in comparison to HPDE-derived cells. The invalidation of TMEM16A expression in these cell lines using siRNA showed an implication of this protein in cell migration but not in the proliferation illustrating that TMEM16A modulates the metastatic potential of pancreatic cancer cells. Contrary to colorectal cancer, the molecular mechanism underlying this effect is still unknown (Sauter et al., 2015).

The last TMEM described in this part is a very peculiar TMEM protein, TMEM88. This protein is a potential 2-transmembrane type protein that interacts with an important component of Wnt signaling pathway: DVL1 (Lee et al., 2010). According to the localization of its partner DVL1, TMEM88 may be localized in the cytoplasm or to the plasma membrane. This protein is overexpressed in cancer tissue compared to non-cancerous tissue in different types of cancer such as in lung, colon, gastric, breast cancer (Yu et al., 2015; Zhang et al., 2015) and can be involved in the tumor initiation and progression through Wnt signaling pathway (Ge et al., 2018). For the majority of these cancer types, immunohistochemistry analysis demonstrated a cytosolic localization. But in the context of NSCLC, two different subcellular localizations for TMEM88 have been reported, suggesting different roles in tumor development depending on its localization. Indeed, an *in vitro* analysis on nine lung cancer cell lines (A549, H1299, H460, H292, SPC-A-1, LTEP-A-2, LK2, PG-BE1, and PG-LH7) showed that the overexpression of membrane-associated TMEM88 led to the inhibition of the canonical Wnt pathway through the downregulation of the expression of effectors like cyclin D1, MMP-7, and c-Myc. The increase in membrane-associated TMEM88 expression also led to a decrease of proliferation, colony formation, migration and invasion and to a decrease in tumor growth *in vivo* highlighting the tumor suppressor role of TMEM88 when it is localized to the membrane of the cell. Furthermore, TMEM88 promoter methylation is associated with unfavorable prognosis in NSCLC (Ma et al., 2017). On the contrary, its cytosolic localization is correlated with a low level of differentiation of the tumor and poor prognosis of patients with NSCLC. Furthermore *in vitro* analysis demonstrated that the overexpression or downregulation of this protein respectively enhanced or suppressed NSCLC cell migration and invasion through a deregulation of the EMT signaling pathway. Indeed, the TMEM88-DVL complex increased p38 and GSK3β phosphorylation leading to a stabilization of the protein SNAIL and hence to a decreased occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) expression. Moreover, *in vivo* analysis showed that the number of lung metastatic nodules increased in the mice transplanted with cell lines expressing cytosolic TMEM88 (Zhang et al., 2015). Very similar results have also been observed in triple-negative breast cancer (Yu et al., 2015). These data confirmed that, in NSCLC and breast cancer, the cytosolic localization of TMEM88 conferred an oncogenic role to the protein.

Depending of cancer stage, TGF-β signaling can have different impact on tumor growth. Indeed, in early stage TGF-β plays a tumor suppressor role whereas in advanced stage, cancer cells benefit from TGF-β to initiate proliferation, invasion, and metastasis dissemination. It seems that several TMEM proteins are involved in tumor growth through TGF-β pathway modulation in order to facilitate malignant progression (**Figure 1**). Indeed, TMEM16A, TMEM158, TMEM14A, TMEM97, TMEM88 and probably TMEM45A interacts with several components of the TGF-β-induced signal transduction.

Through an Unknown Pathway

Other TMEMs have also an impact on tumor growth but the mechanisms by which they act are still unknown. Such an example is TMEM140 that is up regulated in cancer tissue compared to healthy tissue. TMEM140 has been involved in the regulation of the growth of glioma *in vitro* and *in vivo*. Indeed, when TMEM140 is silenced in two glioma cell lines *in vitro*, U87 and U373, the proliferation decreased with a higher proportion of cells in G1 phase and the cell viability decreased due to the activation of the apoptotic pathway. Furthermore, the knockdown of TMEM140 led to a decreased cell adhesion, migration and invasion. It has also been shown that the invalidation of this protein inhibited tumor growth *in vivo* with a decrease in the size and the weight of tumors in the invalidated group compared to the control group (Li et al., 2015a,b). These findings demonstrate that TMEM140 can be used as a prognosis biomarker but also as a therapeutic target.

Two other TMEM proteins have been involved in tumor progression, TMEM45A and TMEM45B, already described above. TMEM45A is implicated in cell proliferation, migration, and invasion of different cancers like glioma (U251 and U373

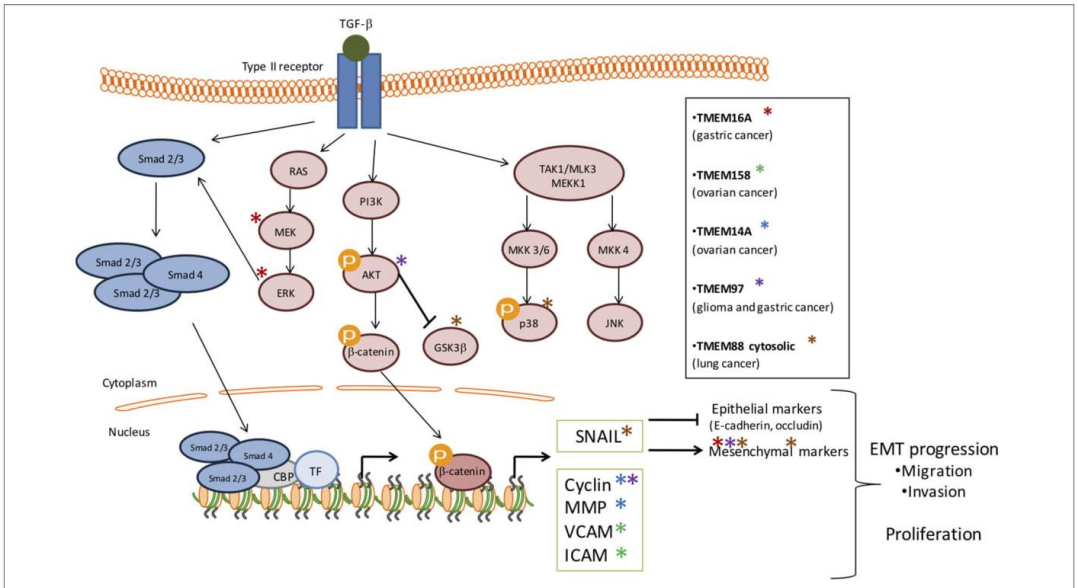


FIGURE 1 | Schematic representation of the involvement of several TMEMs in tumor growth through the TGF-β signaling pathway. The activation of TGF-β signaling pathway has been implicated in many cellular processes and in tumor growth. This activation is induced by its ligand which then activates the phosphorylation of serine/threonine residues and triggers phosphorylation of the intracellular effectors, SMADs (blue). TGF-β receptors can also activate Smad-independent pathways (pink). In early stage TGF-β plays a tumor suppressor role whereas, in advanced stage, cancer cells benefit from TGF-β to initiate proliferation, invasion and metastasis dissemination. It seems that several TMEM proteins are involved in tumor growth through TGF-β activation in order to facilitate malignant progression and EMT progression. The stars represent the effectors deregulated by TMEMs.

cells) and ovarian cancer (HO-8910 and A2780 cells) (Guo et al., 2015; Sun et al., 2015). In the context of ovarian cancer, TMEM45A protein expression has been positively correlated to TGF-β signaling pathway and this data could explain the impact of TMEM45A invalidation in this cancer (Guo et al., 2015). On the other hand, TMEM45B is up-regulated in human lung cancer and promotes tumorigenicity *in vivo*. Invalidation of TMEM45B in A549 and NCI-H1975 cells led to the inhibition of cell proliferation, migration, and invasion highlighting its role in tumor growth in lung cancer (Hu et al., 2016). In the case of pancreatic cancer, TMEM45B had also been involved in proliferation, invasion, and migration since its silencing in SW1990 and PANC-1 cell lines induced an inhibition of cell proliferation associated with cell cycle arrest. It also led to a decrease in cell mobility and invasiveness. Conversely, the overexpression of TMEM45B in CFPAC-1 cells promoted cell proliferation, invasion and migration (Zhao et al., 2016). TMEM45B is also upregulated in osteosarcoma cell lines. Its knockdown suppressed the prolifreation, migration, and invasion of U2OS cells *in vitro* as well as tumor growth in nude mice. These effects were associated with a decrease in the expression of β-catenin, cyclin D1 and c-Myc (Li et al., 2017). Similar results were obtained in gastric cancer cells, in which TMEM45B silencing was associated with a decrease in the abundance of p-STAT3 and p-JAK2 (Shen et al., 2018). These two proteins can be described as potential prognosis markers but also as regulators of tumor growth in several types of cancer.

PART 3: TMEMs INVOLVED IN CHEMORESISTANCE

Although mutagenic alterations have long been associated with cancer development or drug resistance, epigenetic modifications and tumor microenvironment have also been linked to chemoresistance. Both epigenetic modifications and the tumor microenvironment can impact the expression or the localization of several TMEMs leading to a deregulation of treatment responses. The first example is hypoxia, one component of the tumor microenvironment. Indeed, in hypoxic condition (<1% of O_2), hepatocellular carcinoma cells (HepG2) (Sermeus et al., 2008) and breast cancer cells (MDA-MB-231) (Flamant et al., 2010) were protected against cell death normally induced by chemotherapeutic drugs. In this condition, TMEM45A was shown to be upregulated and its silencing led to a decrease in this protective effect conferred by hypoxia against cell death induced by chemotherapeutic agents. These results suggest that, in hypoxic condition, TMEM45A is involved in the chemoresistance of breast and liver cancers. However, the mechanism underlying this protection is still unknown (Flamant et al., 2012).

The second example is related to epigenetic modifications, in particular DNA methylation. Indeed, in ovarian cancer, it has been shown *in vivo*, that the methylation profile of some promoters was different in xenografts resistant to cisplatin compared to control ones. This observation has been associated with a differential expression profile of the genes whose expression is regulated by these promoters. It is the case for TMEM88, which is a DNA methylation-regulated gene. The hypomethylation of TMEM88 promoter observed in ovarian cancer led to an increased expression of the protein and to platinum resistance. Indeed, knowing that TMEM88 was involved in Wnt signaling pathway, De Leon et al investigated the possible association of Wnt pathway and the observed phenotype. First of all, TMEM88 downregulation led to an increase in Wnt target gene expression such as β-catenin or Jun, validating the interaction between TMEM88 and Wnt pathway in ovarian cancer. Then, they studied the link between this interaction and the observed chemoresistance. TMEM88 overexpression in resistant cells inhibited the Wnt signaling pathway associated with a decrease in target gene expression while the activation of the Wnt pathway in resistant cells increased the chemosensitivity of the cells to cisplatin. Furthermore, the invalidation of TMEM88 in cisplatin resistant cells increased the sensitivity of the cells to the chemotherapeutic drug. This increase in chemosensitivity was associated to a decrease in cell proliferation allowing the escape of the cells from the genotoxic effects of cisplatin (de Leon et al., 2016).

Another TMEM involved in chemoresistance is TMEM205, also known as MBC3205. This protein of 21 kDa has four transmembrane domains and belongs to the group of secreted proteins (Clark et al., 2003). In 2011, a study revealed that TMEM205 is highly expressed in the pancreas, adrenal gland, liver, mammary gland and kidney (Shen et al., 2010). This study also showed that, in epidermoid carcinoma, this protein had the particularity to translocate in the presence of cisplatin. Indeed, TMEM205 is located at the cell surface but in the presence of the chemotherapeutic drug, the protein is translocated in an intracellular compartment at the periphery of the nucleus. Furthermore, its expression is increased in a cell line resistant to cisplatin and TMEM205 overexpression conferred resistance to cisplatin (Shen et al., 2010). Another study demonstrated that TMEM205 colocalized with RAB8, a marker of recycling endosomes. Interestingly, TMEM205 also colocalized with syntaxin 6 (STXR6), a regulator of protein trafficking, which is translocated at the same subcellular localization that TMEM205 in the presence of cisplatin. Then, the translocation of TMEM205 may allow the exocytosis of platinum containing vesicles, which thus results in the accumulation of the drug outside the cell (Shen and Gottesman, 2012).

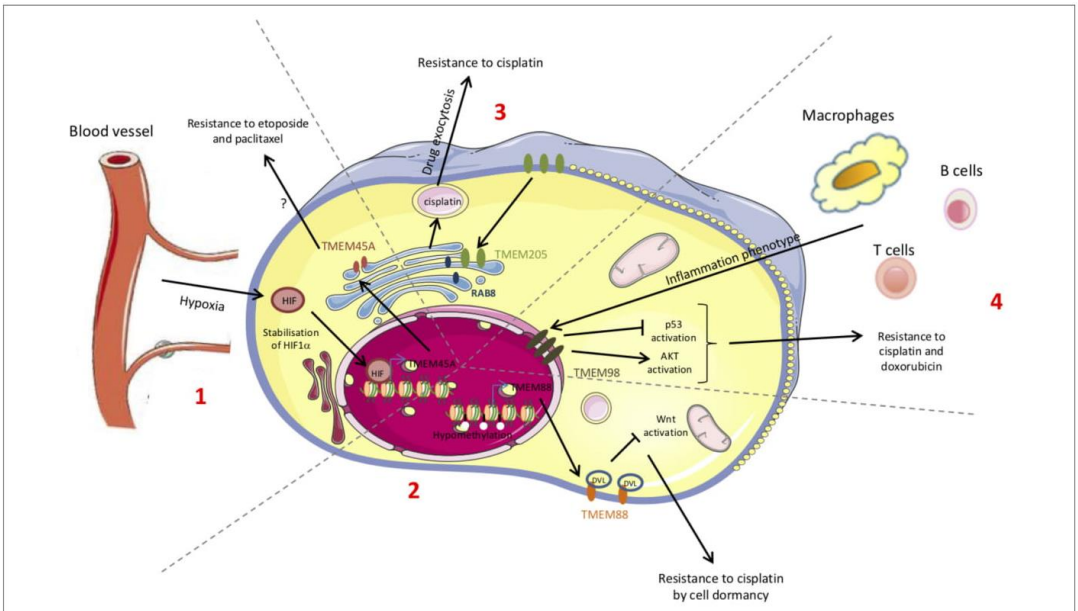


FIGURE 2 | Schematic representation of the chemoresistance mechanisms conferred by TMEM proteins. The chemoresistance can be due to an adaptation of the cancer cells themselves (mutations, DNA methylation, proteins, translocation. . .) but can also be provided from the interactions with the microenvironment. Some of these chemoresistance mechanisms involve TMEM proteins. (1) Hypoxia leads to HIF-1α stabilization and to the expression of several target genes such as TMEM45A. (2) Methylation or acetylation of promoters leads to the transcriptional regulation of genes such as TMEM88. (3) The increase in TMEM205 expression and its translocation modify its partners. (4) The immune system induces the expression of several genes such as TMEM98.

TABLE 1 | List of TMEM proteins involved in cancer.

TMEM	Localization	Function	Cancer			Models		Involvement in cancer	Reference
			Patient	*In vitro*	*In vivo*	*In vitro*	*In vivo*		
TMEM25	Unknown	Immune response	Colorectal adenocarcinoma	/	/	/	/	Tumor suppressor	Katoh and Katoh, 2004; Doolan et al., 2009; Hrasovec et al., 2013
TMEM7	Unknown	Interaction with olfactory receptors	Primary hepatocarcinoma	Hepatocarcinoma	Hepatocarcinoma	SNU398, PLC/PRF/5, HLF, MHCC97	SNU398, PLC/PRF/5	Tumor suppressor	Zhou et al., 2007
TMEM176A	Golgi apparatus (*cis*)	Unknown	Esophageal squamous cell carcinoma and colorectal cancer	Esophageal squamous cell carcinoma and colorectal cancer	Esophageal squamous cell carcinoma and colorectal cancer	BIC1, TE1, TE3, TE13, KYSE140, KYSE180, KYSE410, KYSE450, KYSE520, Segl, KYSE150, YES2, COLO680N and LS180, SW620, HT29, SW480, LOVO, HCT116, RKO and DLD1	KYSE410	Tumor suppressor	Gao et al., 2017; Wang et al., 2017
TMEM97	Unknown	Cholesterol level, growth and differentiation of the liver	Pancreatic cancer	Pancreatic cancer	/	Aspc-1, BxPc-3, Capan-1, Colo-357, T3M4, Mia-Paca-1, Panc-1	/	Tumor suppressor	Murphy et al., 1993; Malhotra et al., 1999; Kannan et al., 2001; Atalay et al., 2002; Kayed et al., 2004
			Ovarian, breast, lung cancer	Glioma and gastric cancer	/	U373, U87 and BGC-823, AGS	/	Oncogene/chemoresistance	Chen et al., 2007; Han et al., 2013; Xiao et al., 2013; Yang et al., 2013; Xu et al., 2014; Qiu et al., 2015; Ding et al., 2016, 2017
TMEM48	Nuclear pore complexes	Assembly and insertion of nuclear pore complexes to the nuclear membrane	Lung carcinoma	Lung carcinoma	Lung carcinoma	A549, H1299	A549	Oncogene	Agudo et al., 2004; Kau et al., 2004; Stavru et al., 2006; D'Angelo and Hetzer, 2008; Qiao et al., 2016

(Continued)

TABLE 1 | Continued

TMEM	Localization	Function	Cancer			Models		Involvement in cancer	Reference
			Patient	*In vitro*	*In vivo*	*In vitro*	*In vivo*		
TMEM45A	Golgi apparatus (trans)	Association with epidermal keratinization	Breast, liver, renal, head and neck, ductal, ovarian cancers and glioma	Glioma, hepatocellular carcinoma, ovarian, breast, cancers	/	U251, U373, HO-8910, A2780, HepG2, MDA-MB231	/	Oncogene/ chemoresistance	Sermeus et al., 2008; Flamant et al., 2010, 2012; Lee et al., 2012; Hayez et al., 2014; Guo et al., 2015; Sun et al., 2015; Wrzesinski et al., 2015; Manawapat-Klopfer et al., 2016
TMEM16A	Plasma membrane	Calcium activated chloride channels	Head and neck, esophageal, breast, prostate, gastric, colorectal cancer	Head and neck, gastric, colorectal cancers	/	Cal-27, Cal-33, BHY, SW620, HCT116, LS174T, AGS, BGC-823	/	Oncogene	Carles et al., 2006; Thomas-Gatewood et al., 2011; Ruiz et al., 2012; Sui et al., 2014; Liu et al., 2015; Sauter et al., 2015
TMEM140	Unknown	Unknown	Glioma	Glioma	/	/	/	Oncogene	Liu et al., 2015; Li et al., 2015a
TMEM158	Unknown	Hypothetical function in a neuronal survival pathway	Ovarian cancer	Ovarian cancer	Ovarian cancer	HO-8910, A2780	HO-8910	Oncogene	Barradas et al., 2002; Zirn et al., 2006; Cheng et al., 2015
TMEM14A	Mitochondria	Inhibition of apoptosis	Hepatocellular carcinoma, ovarian and colon cancers	Ovarian cancer	/	A2780, HO-8910	/	Oncogene	Hodo et al., 2010; Smith et al., 2010; Zhang et al., 2016
TMEM88	Plasma membrane	Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling pathway (membrane associated) and heart development	Lung, breast, colon cancers and hepatocellular, gastric carcinoma	Lung cancer	Lung cancer	A549, H1299, H460, H292, SPC-A-1, LTEP-A-2, LK2, PG-BE1 and PG-LH7	LK2	Tumor suppressor if membrane associated/ chemoresistance	Lee et al., 2010; Yu et al., 2015; Zhang et al., 2015; de Leon et al., 2016; Ge et al., 2018
	Cytosolic						A549, H1299	Oncogene if cytosolic	
TMEM45B	Unknown	Unknown	Lung cancer	Lung, pancreatic cancers	Lung cancer	A549, NCI-H1975, SW1990, PANC-1	A549	Oncogene	Hu et al., 2016; Zhao et al., 2016
	Unknown	Unknown	Osteosarcoma	Osteosarcoma	Osteosarcoma	U2OS	U2OS	Oncogene	Li et al., 2017
	Unknown	Unknown	Gastric cancer	Gastric cancer	/	BGC-823,MGC-803, SGC-7901, HGC-27	/	Oncogene	Shen et al., 2018
TMEM205	Plasma membrane or perinuclear	Hypothetical role in secretion or vesicular trafficking	/	Epidermoid carcinoma	/	KB-3-1, KB-CP3, KB-C-5, Balb/3T3	/	Oncogene/ chemoresistance	Clark et al., 2003; Shen et al., 2010; Shen and Gottesman, 2012
TMEM98	Unknown	Unknown	Lung cancer and hepatocellular carcinoma	Lung cancer and hepatocellular carcinoma	Hepatocellular carcinoma	A549, H460, MHCC97L/CisR, MHCC97L/DoxR	MHCC97L/CisR, MHCC97L/DoxR	Oncogene/ chemoresistance	Ng et al., 2014; Fu et al., 2015; Mao et al., 2015

The table summarizes their localization, function and the type of cancer in which they are implicated, with the corresponding references.

In the tumor microenvironment, the immune system plays a crucial role that modulates tumor growth. Furthermore, cancer-associated inflammation also plays a role in chemoresistance (Chen et al., 2007). In this context, TMEM98, which has immune-related properties, mainly regarding the differentiation of T helper (Th) 1 cells, may be proposed as a novel chemoresistance-conferring gene (Fu et al., 2015). There are two RNA splicing forms of TMEM98 reported in the NCBI database, TMEM98-v1 and TMEM98-v2 respectively. Although there is a slight difference between them in the 5′ UTR sequence, their coding products are almost the same, which consists of 226 amino acids and a molecular weight of 24.6 kDa. In lung cancer, TMEM98 mRNA expression is higher in cancer tissues compared to healthy tissues. Furthermore, in two lung cancer cell lines, A549 and H460, the silencing of TMEM98 inhibited cell proliferation and suppressed the invasion and the migration of cancer cells meaning that this protein can have an impact in tumor growth (Mao et al., 2015). Knowing that tumor progression and chemoresistance can be accompanied with inflammation injuries and the link between TMEM98 and inflammation, this protein is a very interesting target for further investigations on anti-cancer drug resistance. In the case of hepatocellular carcinoma, TMEM98 has been identified as a chemoresistance-associated gene. Indeed, its expression is increased in two chemoresistant cell lines, MHCC97L/CisR and MHCC97L/DoxR resistant to cisplatin and doxorubicin respectively. Furthermore, the level of the upregulation increased with the degree of chemoresistance. This study also showed that TMEM98 mRNA expression was higher in tumor tissue of patients who received a transarterial chemoembolization treatment. Moreover, the patients who did not respond well to the treatment had higher TMEM98 expression level. These data demonstrated that this protein is involved in chemoresistance of hepatocellular carcinoma. In order to identify the mechanism of TMEM88 in chemoresistance, further investigation had been performed. In the absence of TMEM88 in resistant cell lines, a repression of activation of AKT in association with a repression of its downstream targets had been observed. Furthermore, the silencing of TMEM88 restored p53 phosphorylation and activation under cisplatin or doxorubicin treatment. These data showed that the chemoresistance induced by TMEM88 is associated with AKT activation and the repression of p53 activation (Ng et al., 2014).

The platinum-based chemotherapy is used for the treatment of several cancers such as lung cancer. In this model, the high expression level of TMEM97 has been correlated with the resistance of cancer to platinum-based treatment but also with poor patient survival (Chen et al., 2016; Ding et al., 2017). Indeed, Chen et al. (2016), showed that only 4% of patients with elevated expression of TMEM97 showed responses to therapy while 65% of patients with low expression of TMEM97 responded to the treatment. This study proposed TMEM97 as a biomarker of prognosis but also of the responses of NSCLC patients to chemotherapies.

Two other TMEMs could have an impact in chemoresistance via the immune system, TMEM176A and TMEM176B. These two proteins can physically interact one with the other and are both localized in the plasma membrane and vesicular intracellular compartments (Cuajungco et al., 2012). The expression of these two proteins is increased in lymphoma, which may allow the cancer cells to evade the immune system or negatively impact their detection by immune system (Cuajungco et al., 2012).

Knowing that many chemotherapeutic drugs induced cancer cell death, several TMEMs could also have an impact in chemoresistance by exerting an anti-apoptotic function. TMEM48 is such an example for lung cancer (Qiao et al., 2016), TMEM14A for ovarian cancer (Zhang et al., 2016) and TMEM45B for lung and pancreatic cancers (Hu et al., 2016; Zhao et al., 2016).

The resistance to chemotherapy is not only due to the adaptation of cancer cells themselves but can involve tumor microenvironment. Furthermore, the mechanisms underlying the resistance to treatment can differ according to the cancer type and to the chemotherapeutic drug. The studies reported in this review showed that some TMEM proteins are involved in resistance to treatment and so can be used as new therapeutic targets (**Figure 2**). Finally, since TGF-β-induced quiescence renders cancer cells resistant to some anticancer agents (Brown et al., 2017; Tamai et al., 2017) and since many TMEM proteins interfer with TGF-β-induced intracellular signaling, TGF-β pathway is probably one of the key mechanisms through which TMEM proteins exert their effects.

CONCLUSION

Despite the different role and localization of TMEM proteins, many of them are implicated in cancer (**Table 1**). Some of them can be correlated with stages and patient survival and so be used as biomarkers and/or classifiers. Others have a role in carcinogenesis and tumor progression, but for most of them, the mechanism involved is still unknown. A better characterization of these proteins could help to better understand their implication in cancer. A few of them are even involved in chemoresistance and could be used as new therapeutic targets to enhance the efficiency of chemotherapies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KS wrote the review and designed the figures and the table. CM supervised the whole work, contributed to writing, and critically revised the paper.

FUNDING

KS was recipient of a Télévie grant (FNRS, Belgium).

REFERENCES

Agudo, D., Gomez-Esquer, F., Martinez-Arribas, F., Nunez-Villar, M. J., Pollan, M., and Schneider, J. (2004). Nup88 mRNA overexpression is associated with high aggressiveness of breast cancer. *Int. J. Cancer* 109, 717–720. doi: 10.1002/ijc.20034

Akkafa, F., Koyuncu, I., Temiz, E., Dagli, H., Dilmec, F., and Akbas, H. (2018). miRNA-mediated apoptosis activation through TMEM 48 inhibition in A549 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 323–329. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.023

Atalay, A., Crook, T., Ozturk, M., and Yulug, I. G. (2002). Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 839–846. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02751-1

Barradas, M., Gonos, E. S., Zebedee, Z., Kolettas, E., Petropoulou, C., Delgado, M. D., et al. (2002). Identification of a candidate tumor-suppressor gene specifically activated during Ras-induced senescence. *Exp. Cell Res.* 273, 127–137. doi: 10.1006/excr.2001.5434

Brown, J. A., Yonekubo, Y., Hanson, N., Sastre-Perona, A., Basin, A., Rytlewski, J. A., et al. (2017). TGF-beta-induced quiescence mediates chemoresistance of tumor-propagating cells in squamous cell carcinoma. *Cell Stem Cell* 21, 650.e8–664.e8. doi: 10.1016/j.stem.2017.10.001

Carles, A., Millon, R., Cromer, A., Ganguli, G., Lemaire, F., Young, J., et al. (2006). Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display. *Oncogene* 25, 1821–1831. doi: 10.1038/sj.onc.1209203

Chen, R., Alvero, A. B., Silasi, D. A., and Mor, G. (2007). Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am. J. Reprod. Immunol.* 57, 93–107. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00441.x

Chen, R., Fen, Y., Lin, X., Ma, T., Cai, H., and Ding, H. (2016). Overexpression of MAC30 is resistant to platinum-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* 15, 815–820. doi: 10.1177/1533034615605208

Cheng, Z., Guo, J., Chen, L., Luo, N., Yang, W., and Qu, X. (2015). Overexpression of TMEM158 contributes to ovarian carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34:75. doi: 10.1186/s13046-015-0193-y

Clark, H. F., Gurney, A. L., Abaya, E., Baker, K., Baldwin, D., Brush, J., et al. (2003). The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome Res.* 13, 2265–2270. doi: 10.1101/gr.1293003

Cuajungco, M. P., Podevin, W., Valluri, V. K., Bui, Q., Nguyen, V. H., and Taylor, K. (2012). Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochem.* 114, 705–712. doi: 10.1016/j.acthis.2011.12.006

D'Angelo, M. A., and Hetzer, M. W. (2008). Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol.* 18, 456–466. doi: 10.1016/j.tcb.2008.07.009

de Leon, M., Cardenas, H., Vieth, E., Emerson, R., Segar, M., Liu, Y., et al. (2016). Transmembrane protein 88 (TMEM88) promoter hypomethylation is associated with platinum resistance in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 142, 539–547. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.06.017

Ding, H., Gui, X., Lin, X., Chen, R., Ma, T., Sheng, Y., et al. (2017). The prognostic effect of MAC30 expression on patients with non-small cell lung cancer receiving adjuvant chemotherapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* 16, 645–653. doi: 10.1177/1533034616670443

Ding, H., Gui, X. H., Lin, X. B., Chen, R. H., Cai, H. R., Fen, Y., et al. (2016). Prognostic value of MAC30 expression in human pure squamous cell carcinomas of the lung. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 17, 2705–2710.

Dodeller, F., Gottar, M., Huesken, D., Iourgenko, V., and Cenni, B. (2008). The lysosomal transmembrane protein 9B regulates the activity of inflammatory signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 283, 21487–21494. doi: 10.1074/jbc.M801908200

Doolan, P., Clynes, M., Kennedy, S., Mehta, J. P., Germano, S., Ehrhardt, C., et al. (2009). TMEM25, REPS2 and Meis 1: favourable prognostic and predictive biomarkers for breast cancer. *Tumour Biol.* 30, 200–209. doi: 10.1159/000239795

Flamant, L., Notte, A., Ninane, N., Raes, M., and Michiels, C. (2010). Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol. Cancer* 9:191. doi: 10.1186/1476-4598-9-191

Flamant, L., Roegiers, E., Pierre, M., Hayez, A., Sterpin, C., De Backer, O., et al. (2012). TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. *BMC Cancer* 12:391. doi: 10.1186/1471-2407-12-391

Foulquier, F., Amyere, M., Jaeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V., et al. (2012). TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 15–26. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.05.002

Fu, W., Cheng, Y., Zhang, Y., Mo, X., Li, T., Liu, Y., et al. (2015). The secreted form of transmembrane protein 98 promotes the differentiation of T helper 1 cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 35, 720–733. doi: 10.1089/jir.2014.0110

Gao, D., Han, Y., Yang, Y., Herman, J. G., Linghu, E., Zhan, Q., et al. (2017). Methylation of TMEM176A is an independent prognostic marker and is involved in human colorectal cancer development. *Epigenetics* 12, 575–583. doi: 10.1080/15592294.2017.1341027

Ge, Y. X., Wang, C. H., Hu, F. Y., Pan, L. X., Min, J., Niu, K. Y., et al. (2018). New advances of TMEM88 in cancer initiation and progression, with special emphasis on Wnt signaling pathway. *J. Cell Physiol.* 233, 79–87. doi: 10.1002/jcp.25853

Guo, J., Chen, L., Luo, N., Yang, W., Qu, X., and Cheng, Z. (2015). Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* 33, 3124–3130. doi: 10.3892/or.2015.3902

Han, K. Y., Gu, X., Wang, H. R., Liu, D., Lv, F. Z., and Li, J. N. (2013). Overexpression of MAC30 is associated with poor clinical outcome in human non-small-cell lung cancer. *Tumour Biol.* 34, 821–825. doi: 10.1007/s13277-012-0612-z

Hayez, A., Malaisse, J., Roegiers, E., Reynier, M., Renard, C., Haftek, M., et al. (2014). High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization. *Exp. Dermatol.* 23, 339–344. doi: 10.1111/exd.12403

Hodo, Y., Hashimoto, S., Honda, M., Yamashita, T., Suzuki, Y., Sugano, S., et al. (2010). Comprehensive gene expression analysis of 5′-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics* 95, 217–223. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.01.004

Hrasovec, S., Hauptman, N., Glavac, D., Jelenc, F., and Ravnik-Glavac, M. (2013). TMEM25 is a candidate biomarker methylated and down-regulated in colorectal cancer. *Dis. Markers* 34, 93–104. doi: 10.1155/2013/427890

Hu, R., Hu, F., Xie, X., Wang, L., Li, G., Qiao, T., et al. (2016). TMEM45B, up-regulated in human lung cancer, enhances tumorigenicity of lung cancer cells. *Tumour Biol.* 37, 12181–12191. doi: 10.1007/s13277-016-5063-5

Huebner, K. (2001). Tumor suppressors on 3p: a neoclassic quartet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14763–14765. doi: 10.1073/pnas.261586598

Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Kela, I., Kaminski, N., et al. (2001). DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 20, 2225–2234. doi: 10.1038/sj.onc.1204319

Katoh, M., and Katoh, M. (2004). Identification and characterization of human TMEM25 and mouse Tmem25 genes in silico. *Oncol. Rep.* 12, 429–433. doi: 10.3892/or.12.2.429

Kau, T. R., Way, J. C., and Silver, P. A. (2004). Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat. Rev. Cancer* 4, 106–117. doi: 10.1038/nrc1274

Kayed, H., Kleeff, J., Ding, J., Hammer, J., Giese, T., Zentgraf, H., et al. (2004). Expression analysis of MAC30 in human pancreatic cancer and tumors of the gastrointestinal tract. *Histol. Histopathol.* 19, 1021–1031.

Lee, H. J., Finkelstein, D., Li, X., Wu, D., Shi, D. L., and Zheng, J. J. (2010). Identification of transmembrane protein 88 (TMEM88) as a dishevelled-binding protein. *J. Biol. Chem.* 285, 41549–41556. doi: 10.1074/jbc.M110.193383

Lee, S., Stewart, S., Nagtegaal, I., Luo, J., Wu, Y., Colditz, G., et al. (2012). Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma

in situ to invasive breast cancer. *Cancer Res.* 72, 4574–4586. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0636

Li, Y., Guo, W., Liu, S., Zhang, B., Yu, B. B., Yang, B., et al. (2017). Silencing transmembrane protein 45B (TNEM45B) inhibits proliferation, invasion, and tumorigenesis in osteosarcoma cells. *Oncol. Res.* 25, 1021–1026. doi: 10.3727/096504016X14821477992177

Li, B., Huang, M. Z., Wang, X. Q., Tao, B. B., Zhong, J., Wang, X. H., et al. (2015a). Erratum: TMEM140 is associated with the prognosis of glioma by promoting cell viability and invasion. *J. Hematol. Oncol.* 8:101. doi: 10.1186/s13045-015-0199-0

Li, B., Huang, M. Z., Wang, X. Q., Tao, B. B., Zhong, J., Wang, X. H., et al. (2015b). TMEM140 is associated with the prognosis of glioma by promoting cell viability and invasion. *J. Hematol. Oncol.* 8:101. doi: 10.1186/s13045-015-0199-0

Liu, F., Cao, Q. H., Lu, D. J., Luo, B., Lu, X. F., Luo, R. C., et al. (2015). TMEM16A overexpression contributes to tumor invasion and poor prognosis of human gastric cancer through TGF-beta signaling. *Oncotarget* 6, 11585–11599.

Ma, R., Feng, N., Yu, X., Lin, H., Zhang, X., Shi, O., et al. (2017). Promoter methylation of Wnt/beta-Catenin signal inhibitor TMEM88 is associated with unfavorable prognosis of non-small cell lung cancer. *Cancer Biol. Med.* 14, 377–386. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0061

Mahipal, A., and Malafa, M. (2016). Importins and exportins as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* 164, 135–143. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.020

Malhotra, K., Luehrsen, K. R., Costello, L. L., Raich, T. J., Sim, K., Foltz, L., et al. (1999). Identification of differentially expressed mRNAs in human fetal liver across gestation. *Nucleic Acids Res.* 27, 839–847. doi: 10.1093/nar/27.3.839

Manawapat-Klopfer, A., Thomsen, L. T., Martus, P., Munk, C., Russ, R., Gmuender, H., et al. (2016). TMEM45A, SERPINB5 and p16INK4A transcript levels are predictive for development of high-grade cervical lesions. *Am. J. Cancer Res.* 6, 1524–1536.

Mao, M., Chen, J., Li, X., and Wu, Z. (2015). siRNA-TMEM98 inhibits the invasion and migration of lung cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 15661–15669.

Matsuba, S., Niwa, S., Muraki, K., Kanatsuka, S., Nakazono, Y., Hatano, N., et al. (2014). Downregulation of Ca2(-activated Cl- channel TMEM16A by the inhibition of histone deacetylase in TMEM16A-expressing cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 351, 510–518. doi: 10.1124/jpet.114.217315

Murphy, M., Pykett, M. J., Harnish, P., Zang, K. D., and George, D. L. (1993). Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell Growth Differ.* 1993, 715–722.

Ng, K. T., Lo, C. M., Guo, D. Y., Qi, X., Li, C. X., Geng, W., et al. (2014). Identification of transmembrane protein 98 as a novel chemoresistance-conferring gene in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1285–1297. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0806

Qiao, W., Han, Y., Jin, W., Tian, M., Chen, P., Min, J., et al. (2016). Overexpression and biological function of TMEM48 in non-small cell lung carcinoma. *Tumour Biol.* 37, 2575–2586. doi: 10.1007/s13277-015-4014-x

Qiu, G., Sun, W., Zou, Y., Cai, Z., Wang, P., Lin, X., et al. (2015). RNA interference against TMEM97 inhibits cell proliferation, migration, and invasion in glioma cells. *Tumour Biol.* 36, 8231–8238. doi: 10.1007/s13277-015-3552-6

Ramalho-Carvalho, J., Goncalves, C. S., Graca, I., Bidarra, D., Pereira-Silva, E., Salta, S., et al. (2018). multiplatform approach identifies miR-152-3p as a common epigenetically regulated onco-suppressor in prostate cancer targeting TMEM97. *Clin. Epigenet.* 10:40. doi: 10.1186/s13148-018-0475-2

Ruiz, C., Martins, J. R., Rudin, F., Schneider, S., Dietsche, T., Fischer, C. A., et al. (2012). Enhanced expression of ANO1 in head and neck squamous cell carcinoma causes cell migration and correlates with poor prognosis. *PLoS One* 7:e43265. doi: 10.1371/journal.pone.0043265

Sauter, D. R. P., Novak, I., Pedersen, S. F., Larsen, E. H., and Hoffmann, E. K. (2015). ANO1 (TMEM16A) in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Pflugers Arch.* 467, 1495–1508. doi: 10.1007/s00424-014-1598-8

Sermeus, A., Cosse, J. P., Crespin, M., Mainfroid, V., de Longueville, F., Ninane, N., et al. (2008). Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity. *Mol. Cancer* 7:27. doi: 10.1186/1476-4598-7-27

Shen, D. W., and Gottesman, M. M. (2012). RAB8 enhances TMEM205-mediated cisplatin resistance. *Pharm. Res.* 29, 643–650. doi: 10.1007/s11095-011-0562-y

Shen, D. W., Ma, J., Okabe, M., Zhang, G., Xia, D., and Gottesman, M. M. (2010). Elevated expression of TMEM205, a hypothetical membrane protein, is associated with cisplatin resistance. *J. Cell Physiol.* 225, 822–828. doi: 10.1002/jcp.22287

Shen, K., Yu, W., Yu, Y., Liu, X., and Cui, X. (2018). Knockdown of TMEM45B inhibits cell proliferation and invasion in gastric cancer. *Biomed. Pharmacother.* 104, 576–581. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.016

Smith, J. J., Deane, N. G., Wu, F., Merchant, N. B., Zhang, B., Jiang, A., et al. (2010). Experimentally derived metastasis gene expression profile predicts recurrence and death in patients with colon cancer. *Gastroenterology* 138, 958–968. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.005

Song, Y., Gao, J., Guan, L., Chen, X., Gao, J., and Wang, K. (2018). Inhibition of ANO1/TMEM16A induces apoptosis in human prostate carcinoma cells by activating TNF-alpha signaling. *Cell Death Dis.* 9:703. doi: 10.1038/s41419-018-0735-2

Stavru, F., Hulsmann, B. B., Spang, A., Hartmann, E., Cordes, V. C., and Gorlich, D. (2006). NDC1: a crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes. *J. Cell Biol.* 173, 509–519. doi: 10.1083/jcb.200601001

Sui, Y., Sun, M., Wu, F., Yang, L., Di, W., Zhang, G., et al. (2014). Inhibition of TMEM16A expression suppresses growth and invasion in human colorectal cancer cells. *PLoS One* 9:e115443. doi: 10.1371/journal.pone.0115443

Sun, W., Qiu, G., Zou, Y., Cai, Z., Wang, P., Lin, X., et al. (2015). Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 12657–12667.

Tamai, M., Furuichi, Y., Kasai, S., Ando, N., Harama, D., Goi, K., et al. (2017). TGFbeta1 synergizes with FLT3 ligand to induce chemoresistant quiescence in acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. *Leuk Res.* 61, 68–76. doi: 10.1016/j.leukres.2017.08.013

Thomas-Gatewood, C., Neeb, Z. P., Bulley, S., Adebiyi, A., Bannister, J. P., Leo, M. D., et al. (2011). TMEM16A channels generate Ca(2)(()-activated Cl(-) currents in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 301, H1819–H1827. doi: 10.1152/ajpheart.00404.2011

Vinothkumar, K. R., and Henderson, R. (2010). Structures of membrane proteins. *Quart. Rev. Biophys.* 43, 65–158. doi: 10.1017/S0033583510000041

von Heijne, G. (2006). Membrane-protein topology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 909–918. doi: 10.1038/nrm2063

Wang, Y., Zhang, Y., Herman, J. G., Linghu, E., and Guo, M. (2017). Epigenetic silencing of TMEM176A promotes esophageal squamous cell cancer development. *Oncotarget* 8, 70035–70048. doi: 10.18632/oncotarget.19550

Wrzesinski, T., Szelag, M., Cieslikowski, W. A., Ida, A., Giles, R., Zodro, E., et al. (2015). Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. *BMC Cancer* 15:518. doi: 10.1186/s12885-015-1530-4

Xiao, M., Li, H., Yang, S., Huang, Y., Jia, S., Wang, H., et al. (2013). Expression of MAC30 protein is related to survival and clinicopathological variables in breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 107, 456–462. doi: 10.1002/jso.23269

Xu, X. Y., Zhang, L. J., Yu, Y. Q., Zhang, X. T., Huang, W. J., Nie, X. C., et al. (2014). Down-regulated MAC30 expression inhibits proliferation and mobility of human gastric cancer cells. *Cell Physiol. Biochem.* 33, 1359–1368. doi: 10.1159/000358703

Yang, S., Li, H., Liu, Y., Ning, X., Meng, F., Xiao, M., et al. (2013). Elevated expression of MAC30 predicts lymph node metastasis and unfavorable prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Med. Oncol.* 30:324. doi: 10.1007/s12032-012-0324-7

Yu, X., Zhang, X., Zhang, Y., Jiang, G., Mao, X., and Jin, F. (2015). Cytosolic TMEM88 promotes triple-negative breast cancer by interacting with Dvl. *Oncotarget* 6, 25034–25045. doi: 10.18632/oncotarget.4379

Zhang, Q., Chen, X., Zhang, X., Zhan, J., and Chen, J. (2016). Knockdown of TMEM14A expression by RNAi inhibits the proliferation and invasion of human ovarian cancer cells. *Biosci. Rep.* 36:e00298. doi: 10.1042/BSR20150258

Zhang, X., Yu, X., Jiang, G., Miao, Y., Wang, L., Zhang, Y., et al. (2015). Cytosolic TMEM88 promotes invasion and metastasis in lung cancer cells by binding DVLS. *Cancer Res.* 75, 4527–4537. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3828

Zhao, L. C., Shen, B. Y., Deng, X. X., Chen, H., Zhu, Z. G., and Peng, C. H. (2016). TMEM45B promotes proliferation, invasion and migration and inhibits

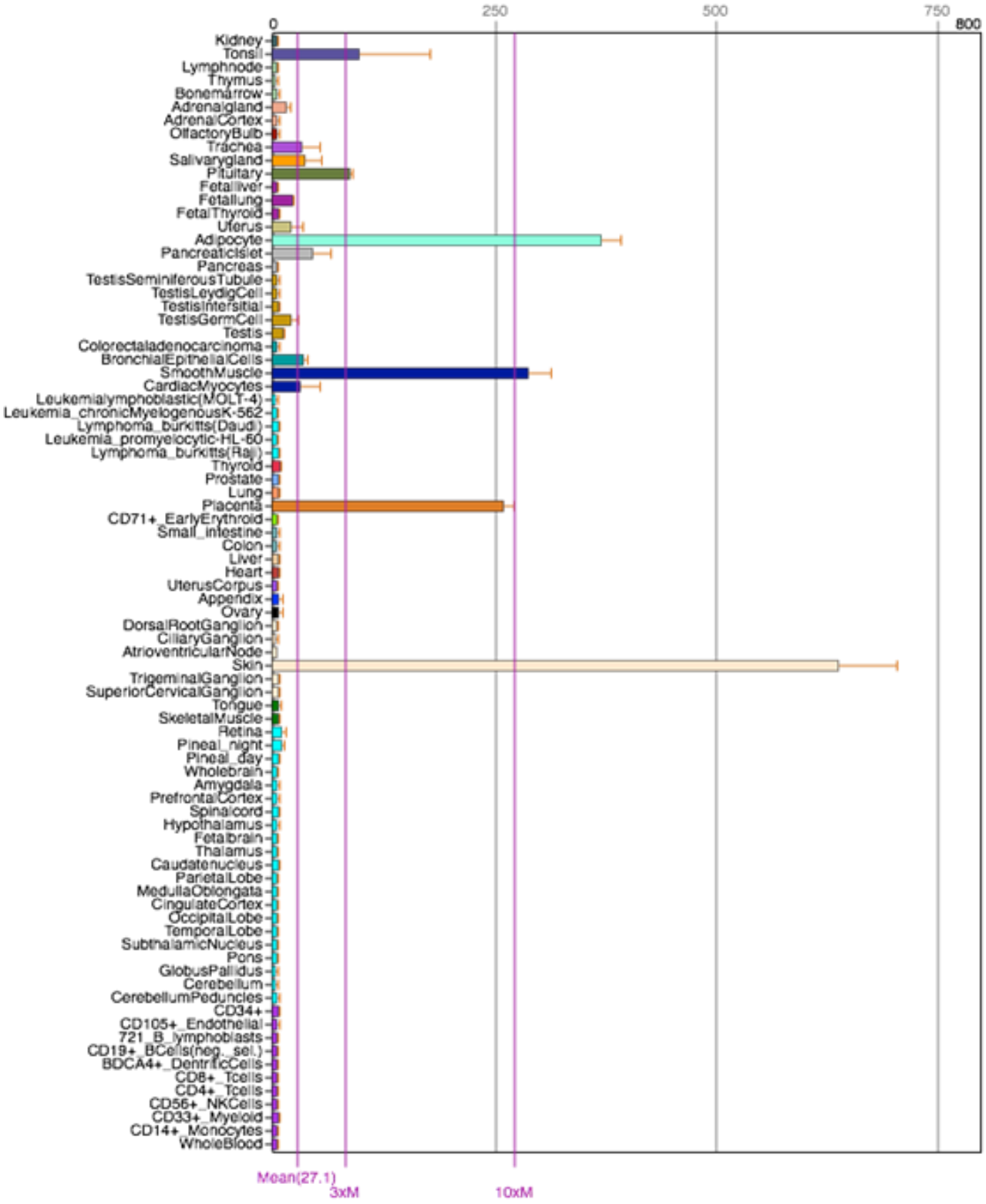
apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol. Biosyst.* 12, 1860–1870. doi: 10.1039/C6MB00203J

Zhou, X., Popescu, N. C., Klein, G., and Imreh, S. (2007). The interferon-alpha responsive gene TMEM7 suppresses cell proliferation and is downregulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 177, 6–15. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2007.04.007

Zirn, B., Samans, B., Wittmann, S., Pietsch, T., Leuschner, I., Graf, N., et al. (2006). Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 565–574. doi: 10.1002/gcc.20319

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Schmit and Michiels. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



<u>Figure I10</u> : Niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A dans différents tissus humains (<u>www.biogps.org</u>)

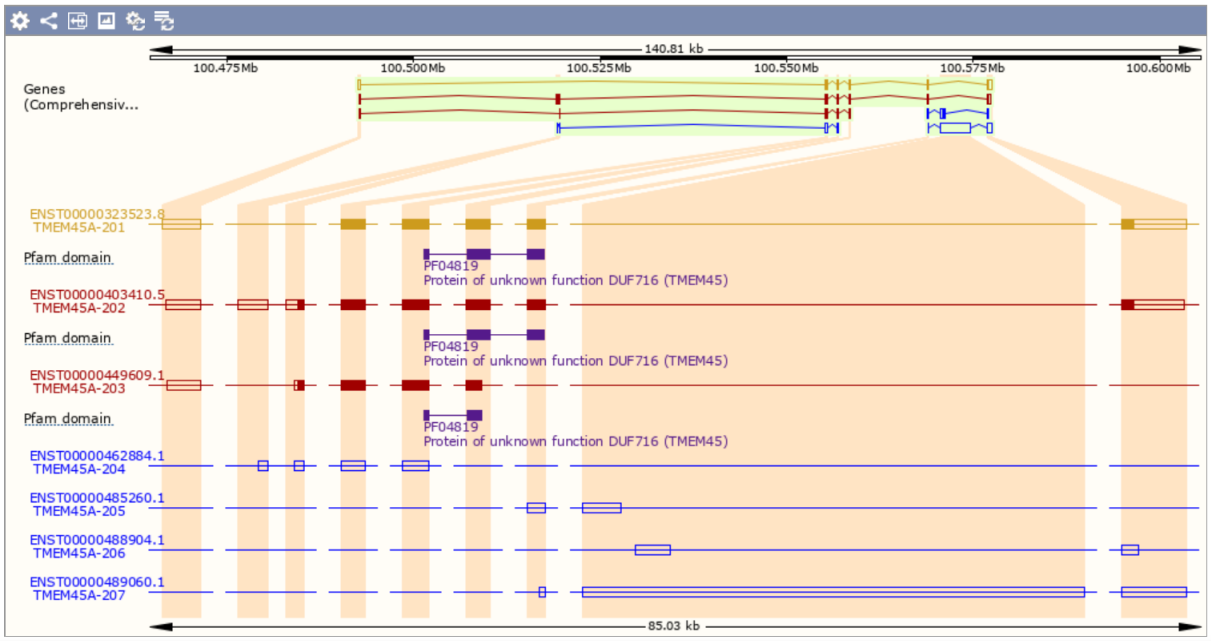


Figure I11 : Représentation schématique de l'épissage alternatif de l'ARNm de TMEM45A chez l'Homme. Les transcrits en jaune ou en rouge sont codants, ceux en bleu sont non codants. (Ensembl)

Show/hide columns (1 hidden) Filter

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt	RefSeq	Flags
TMEM45A-201	ENST00000323523.8	1567	275aa	Protein coding	CCDS2937	Q9NWC5	NM_018004 NP_060474	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P2
TMEM45A-202	ENST00000403410.5	1910	291aa	Protein coding	-	J3KQ06	NP_001350805	TSL:5 GENCODE basic APPRIS ALT2
TMEM45A-203	ENST00000449609.1	874	191aa	Protein coding	-	C9J9Z5	-	CDS 3' incomplete TSL:3
TMEM45A-204	ENST00000462884.1	560	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:2
TMEM45A-205	ENST00000485260.1	452	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:2
TMEM45A-206	ENST00000488904.1	431	No protein	Processed transcript	-	-	-	TSL:3
TMEM45A-207	ENST00000489060.1	4615	No protein	Retained intron	-	-	-	TSL:1

Figure I12 : Tableau reprenant les différents transcrits de TMEM45A chez l'Homme. Les trois premiers transcrits codent pour des protéines de 275 ; 291 et 191 acides aminés. (Ensembl)

2. *La famille TMEM45*

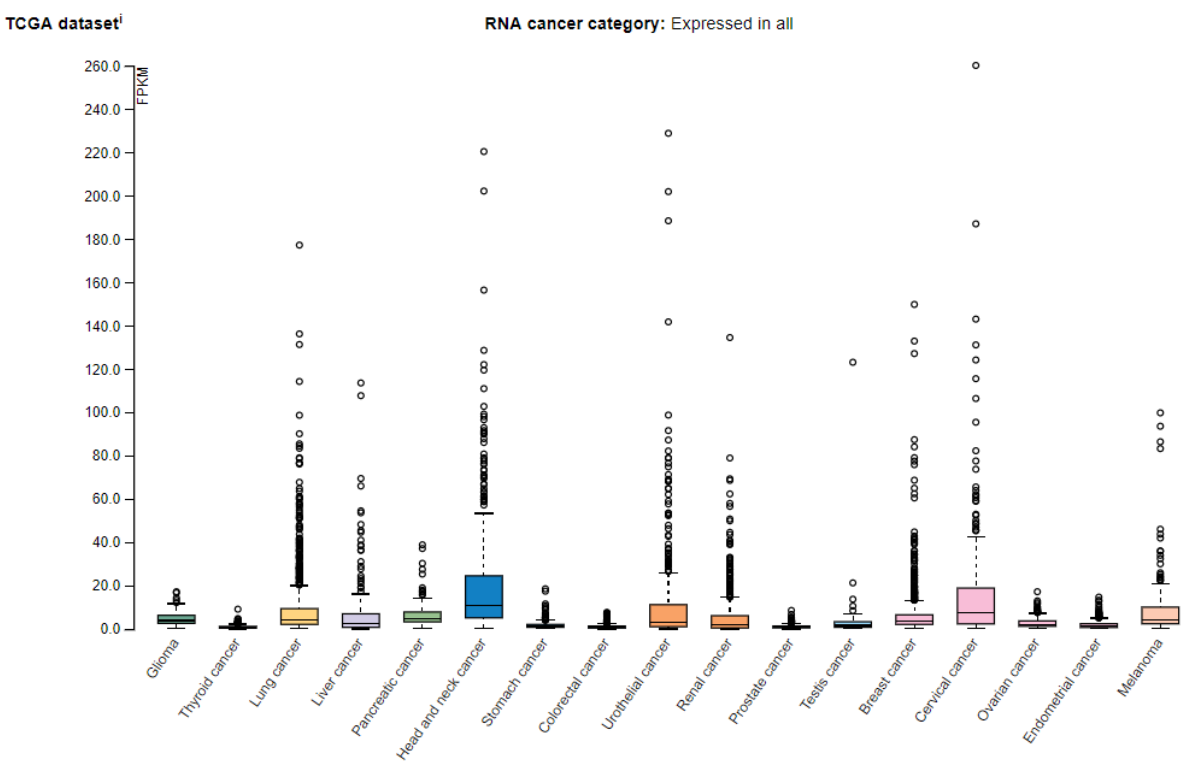
La protéine TMEM45A aussi connue sous le nom de DERP7, FLJ10134 et DNAPTP4 fait partie de la famille TMEM45 (fonction inconnue DUF716) qui encode des protéines transmembranaires non caractérisées. Cette famille comprend trois membres considérés comme paralogues : TMEM45A, TMEM45B (BC016153 ou FLJ40787) et TEDDM1 (TMEM45C, EDDM9, Epdd1 ou HE9) (Uniprot). Le gène *TMEM45B* code pour cinq transcrits dont deux seulement codent pour une protéine fonctionnelle. Le gène *TMEM45C* code quant à lui un seul transcrit produisant la protéine transmembranaire épididymale 1. BioGPS regroupe les analyses qui étudient l'expression de l'ARNm de différents gènes chez l'homme et chez la souris. Chez l'homme, l'ARNm de *TMEM45B* est exprimé exclusivement dans le colon et le rectum alors que l'ARNm de *TMEM45C* est majoritairement retrouvé dans l'épididyme (BioGPS). La figure I10 montre que l'ARNm de *TMEM45A* est fortement exprimé dans la peau, le placenta, le tissu adipeux et les muscles lisses chez l'humain. Flamant et al ont d'ailleurs montré que *TMEM45A* était exprimé par les kératinocytes humains différenciés (Flamant, Roegiers et al. 2012).

Il existe 44% et 36% d'identité entre la protéine TMEM45A et ces deux paralogues, TMEM45B et TMEM45C respectivement (NCBI). Très peu d'informations sont disponibles concernant ces protéines. Cela est probablement dû aux difficultés rencontrées lors de leur extraction ou de leur analyse. En effet, TMEM45B possède des domaines qui seraient responsables de son agrégation thermique dans les gels SDS-PAGE (Okada, Yamamoto et al. 2011).

3. *TMEM45A*

Chez l'homme, le gène *TMEM45A* est localisé dans la région 12.2 du petit bras du chromosome 3. Il existe 7 transcrits connus de *TMEM45A* produits par épissage alternatif (figure I11). Cependant, seulement 3 de ces transcrits sont codants (figure I12) (Ensembl). Le promoteur du gène *TMEM45A* contient un site spécifique NF-Y et un site de liaison pour HIF-1 indiquant que son expression serait induite en condition d'hypoxie. Des études récentes ont effectivement démontré que l'expression du gène *TMEM45A* est induite par l'hypoxie dans les cellules HepG2 et MDA-MB-231 comme explicité dans le point 6 du chapitre 2 mais également dans les cellules MCF7 et les cellules HeLa (Benita, Kikuchi et al. 2009, Flamant, Roegiers et al. 2012)

Très peu de choses sont connues sur la protéine TMEM45A. Elle est prédite comme étant transmembranaire, avec 3, 5 ou 7 domaines transmembranaires. Elle possède également un domaine pfam DUF716 (domain of unknown function) associé à la famille des protéines TMEM45. Il existe trois isoformes de la protéine prédite avec 191; 275 ou 291 acides aminés et 21,9; 31,7 et 33,5 kDa (figure I12) (Ensembl). Le gène est conservé parmi les espèces puisqu'il possède 72 orthologues notamment chez le chimpanzé, le chien et le zebrafish avec



<u>Figure I13</u> : Niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A dans différents types de cancer. Le niveau d'expression de TMEM45A a été analysé par The Cancer Genome Atlas (TCGA) via une expérience de RNA sequencing dans 17 types de cancer et est reporté sur ce graphique par la médiane du nombre de fragments par kilobase d'exon pour un million de read. TMEM45A est le plus fortement exprimé dans le cancer de la tête et du cou. (The Human Protein Atlas)

100 %, 78% et 46% d'identité respectivement. Cependant, on ne retrouve pas d'orthologues du gène chez les drosophiles ni chez *C. elegans*, indiquant que *TMEM45A* est important pour les organismes plus complexes (www.ensembl.org).

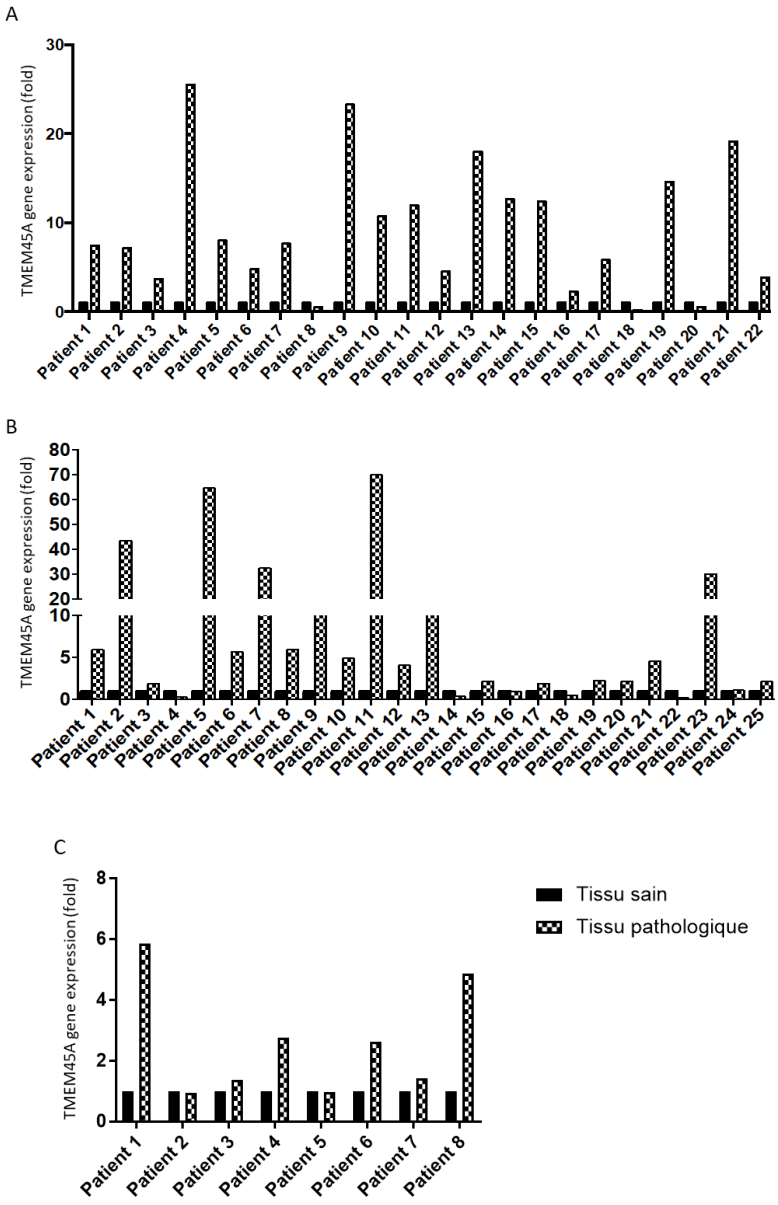
Une étude récente réalisée par Hayez et al a montré que TMEM45A est localisée dans le réseau trans-golgien. De plus, cette protéine a été définie comme étant un marqueur de différenciation tardif des kératinocytes. En effet, il a été mis en évidence une corrélation entre une augmentation de son niveau d'expression et la différenciation épidermique (Mattiuzzo, Toulza et al. 2011, Hayez, Malaisse et al. 2014). Cependant, aucune implication de TMEM45A dans la morphogénèse, la différentiation épidermique et la formation de la barrière de l'épiderme n'a été mise en évidence. En effet, une lignée de souris knockout pour TMEM45A a été générée et aucune altération morphologique de la barrière épithéliale n'a été observée lors de l'embryogenèse ou chez les animaux adultes (Hayez, Roegiers et al. 2016).

Les résultats obtenus par Aurélie Hayez durant sa thèse ont également montré que l'absence d'expression de TMEM45A entrainait l'apparition de granules denses non identifiées et altérait la distribution des endosomes précoces (EEA1 et VPS26).

4. TMEM45A dans les pathologies

Des études sur l'implication de TMEM45A dans les pathologies ont révélé une augmentation de son niveau d'expression dans les biopsies de peau avec des lésions de psoriasis et de kératose actinique mais pas dans les biopsies de dermatite atopique, mélanomes et carcinomes basocellulaire ou spinocellulaire (Hudson, Gale et al. 2010, Gerber, Buhren et al. 2014, Lambert, Mladkova et al. 2014). Cependant, dans les bases de données telles que The Human Protein Atlas, *TMEM45A* semble être exprimé dans différents types de cancer (figure I13). De plus, comme décrit dans la revue citée précédemment, TMEM45A a été impliquée dans la prolifération et l'invasion du cancer de l'ovaire et du gliome (Guo, Chen et al. 2015, Sun, Qiu et al. 2015). Une augmentation du niveau de l'expression de *TMEM45A* a également été associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer du sein, de l'ovaire et de la vessie. (Crijns, Fehrmann et al. 2009, Flamant, Roegiers et al. 2012, Urquidi, Goodison et al. 2012). Paradoxalement, Lee et al ont montré *in vivo*, que TMEM45A inhiberait la progression du cancer du sein (Lee, Stewart et al. 2012).

De plus, Flamant et al ont mis en évidence une implication de TMEM45A dans la chimiorésistance des cellules HepG2 et MDA-MB-231 en condition d'hypoxie (Flamant, Roegiers et al. 2012). Ainsi il serait intéressant d'étudier l'implication de cette protéine dans la croissance tumorale mais également dans la réponse des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques dans d'autres types de cancer (K. Schmit, données non publiées).



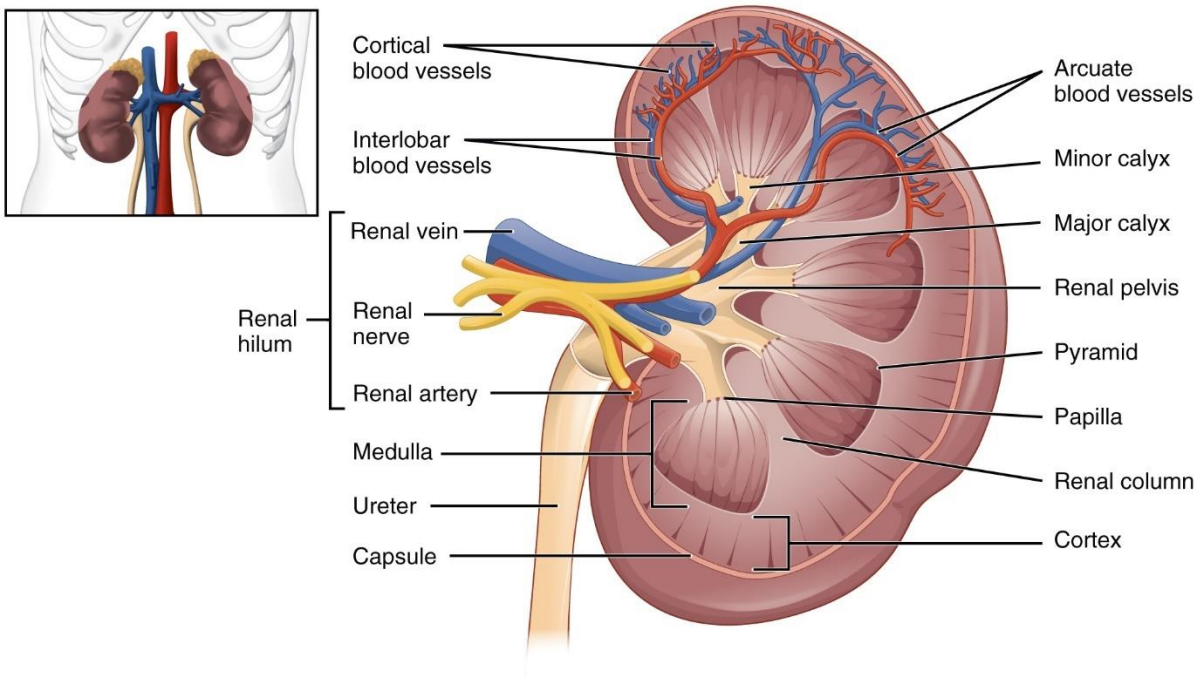
<u>Figure I14</u> : Niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A dans le cancer de la tête et du cou, le cancer du rein et le cancer du sein chez l'Homme. Après biopsies, les ARN totaux ont été extraits des tissus tumoraux et des tissus sains adjacents pour chaque patient puis l'ARNm de TMEM45A a été quantifié par RT-qPCR en utilisant 23 *kDa* comme gène de référence pour le cancer de la tête et du cou (A), le cancer du rein (B) et le cancer du sein (C).

5. *Expression de TMEM45A dans le cancer*

Le niveau d'expression de l'ARNm du gène *TMEM45A* a été étudié dans des biopsies de patients atteints de différents types de cancer. Cette étude a été réalisée en collaboration avec la biobanque du CHU-UCL Namur -Mont Godinne. Pour cela, l'expression du gène *TMEM45A* a été analysée par RT-qPCR dans le tissu cancéreux en comparaison au tissu sein pour chaque patient atteint de différents types de cancer. Un pré-screen réalisé sur neuf types de cancer dont le cancer du rein, du sein, du poumon, de la tête et du cou, du foie et du colon a révélé une forte surexpression de TMEM45A (au moins 5 fois plus) dans le tissu tumoral en comparaison au tissu sain dans le cas du cancer du sein, du rein et de la sphère ORL. Au vu de ces résultats, une analyse plus approfondie a été réalisée pour ces trois modèles (figure I14). Les résultats ont mis en lumière que l'abondance de l'ARNm de TMEM45A était augmentée dans le tissu tumoral en comparaison au tissu sain pour 76% des patients atteints de cancer rénal, 86% des patients atteints de cancer de la tête et du cou et 75% des patients atteints de cancer du sein. Nous avons donc décidé de continuer notre étude dans deux modèles de cancers : le cancer du rein et de cancer de la tête et du cou.

Conclusion

Très peu est connu sur la protéine TMEM45A. La majorité des informations concernant cette protéine provient des bases de données telles que Ensembl, BioGPS ou The Human Protein Atlas. Cependant, les études réalisées sur TMEM45A ont montré que cette protéine serait impliquée dans la régulation de la croissance tumorale et dans la réponse aux traitements. A la vue du niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A dans les tissus cancéreux en comparaison aux tissus sains adjacents pour les patients atteints de cancer du rein et de cancer de la tête et du cou, nous avons décidé d'étudier dans le cadre de cette thèse l'implication de TMEM45A dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses et dans la résistance aux traitements de ces deux types de cancer.



<u>Figure I15</u> : Anatomie interne du rein. Représentation d'une coupe frontale du rein illustrant les différentes régions qui composent le rein, la région superficielle appelée cortex rénal et la région profonde appelée la médulla. La médulla est composée de pyramides rénales à la base desquelles se trouve un canal collecteur transportant l'urine produite par les néphrons, unité fonctionnelle du rein, afin de permettre son excrétion. (philschatz.com)

Chapitre 4 : Cancer rénal

Les reins, au nombre de deux, sont des organes qui assurent la filtration du sang et l'évacuation via l'urine des déchets du corps. De couleur rouge-brun, le rein possède une forme typique de haricot mesurant chez l'adulte 12 cm de longueur, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur. Les reins sont situés de part et d'autre de la colonne vertébrale au niveau de la partie arrière de l'abdomen et plus particulièrement en position rétropéritonéale dans la région lombaire supérieure. Chaque rein est surmonté d'une glande surrénale, organe appartenant au système endocrinien et non impliqué dans la fonction urinaire.

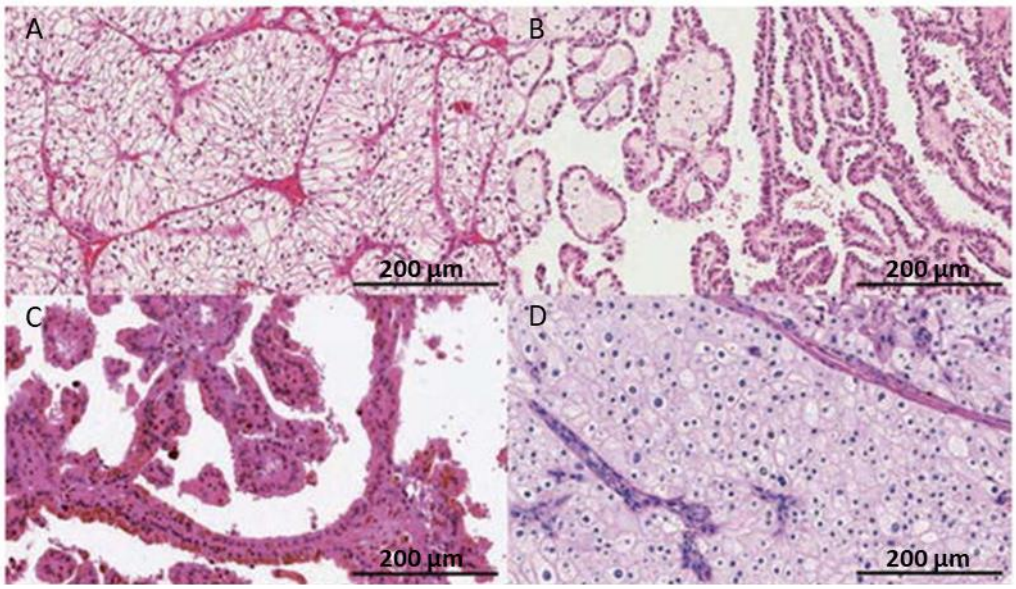
Le rein est composé de plusieurs parties : la capsule, enveloppe externe qui protège le rein, le parenchyme rénal comprenant le cortex et la médulla qui renferment les néphrons, unités fonctionnelles du rein et les calices et le bassinet (ou pelvis), cavités où sont collectées les urines. Au centre du bord concave du rein se trouve une échancrure verticale profonde appelée hile rénal. C'est à ce niveau que l'uretère, les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques ainsi que les nerfs quittent le rein (Marieb and Katja 2015 ; Tortora and Grabowski 2001) (figure I15).

La fonction première des reins est d'éliminer les déchets toxiques produits par le fonctionnement normal de l'organisme et transportés par le sang. Les reins permettent également à l'organisme de maintenir la quantité d'eau qui lui est nécessaire et assurent le maintien des minéraux dont l'organisme a besoin à un niveau constant, les excédents étant éliminés dans les urines. C'est également le cas des acides en excès provenant de l'alimentation, qui sont éliminés pour maintenir la composition idéale du sang.

En plus de leur rôle de régulateur et de filtre, les reins produisent également plusieurs hormones, des enzymes et des vitamines dont la rénine, indispensable à la régulation de la tension artérielle, l'érythropoïétine (EPO) qui agit sur la moelle osseuse pour produire des globules rouges en quantité suffisante pour véhiculer l'oxygène dans l'organisme et le calcitriol, forme active de la vitamine D, qui permet l'absorption du calcium par l'intestin et sa fixation dans les os, afin de garantir leur bon état et leur robustesse.

1. Classification et caractéristiques des cancers rénaux

Les cancers rénaux sont des tumeurs malignes formées de cellules du rein et pouvant être classés en fonction de leur origine de développement dans l'organe. Chez l'adulte, les cancers rénaux peuvent se développer soit au niveau du parenchyme rénal, on parle alors de carcinomes à cellules rénales, soit au niveau du pelvis rénal aussi appelé carcinomes du tractus urinaire supérieur. Chez l'enfant, la majorité des cancers rénaux sont des néphroblastomes appelés



<u>Figure I16</u> : Histologie des différents sous-groupes de carcinomes à cellules rénales. (A) 75% des carcinomes à cellules rénales (RCC) sont des RCC à cellules claires. (B et C) Environ 15% sont des RCC papillaires que l'on peut diviser en deux sous-groupes, les RCC papillaires de type 1 basophiles (B) et les RCC papillaires de type 2 éosinophiles (C). (D) Les RCC chromophobes représentent quant à eux 5 % des RCC. Les tumeurs ne rentrant pas dans cette classification sont désignées comme des RCC non classifiés. (Hsieh, Purdue et al. 2017)

tumeur de Wilms représentant 1,1% de l'ensemble des cancers rénaux. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux carcinomes à cellules rénales, tumeurs les plus courantes. De ce fait, les cancers du pelvis rénal et les néphroblastomes n'ont pas été décrits dans ce chapitre.

Les carcinomes à cellules rénales (RCC), cancer du rein le plus courant, forment un groupe de cancers hétérogènes dérivant de la paroi des tubules rénaux composant le néphron. Il existe différents sous-types de RCC dont le RCC à cellules claires (ccRCC), groupe le plus commun représentant 75 à 80% des cas de carcinomes rénaux, le RCC papillaire (pRCC) (10-15% des cas) et le RCC chromophobe (chRCC) (5% des cas) (Hsieh, Purdue et al. 2017). Il est possible de retrouver deux tumeurs distinctes appartenant à deux groupes différents sur le même rein mais cet évènement reste rare. Ces différents sous-groupes se distinguent entre eux par des différences génétiques, biologiques et comportementales (figure I16). Afin d'identifier et de classer les différents groupes de RCC, les pathologistes effectuent des analyses sur le plan histologique, immunohistochimique (VEGF-A, CD31-AML, Ki67, p53 et PAR-3), cytogénétique (ACPA, FISH), et moléculaire (NGS : statut du gène *VHL* : délétion, mutation et/ou hyperméthylation du promoteur). Les pRCC et chRCC sont de meilleur pronostic que les ccRCC (Delahunt, Bethwaite et al. 2007).

1.1 RCC à cellules claires

Le ccRCC, groupe de RCC le plus prédominant, possède un profil d'altérations chromosomiques bien défini. L'ensemble de ces altérations, pertes d'hétérozygoties et gains chromosomiques, est présenté dans l'article de Chen et al (Chen, Ye et al. 2009). Le ccRCC peut être sporadique (plus de 96%) ou familial (moins de 4 %) mais dans les deux cas, il est associé à une mutation du gène *VHL* menant à la stabilisation du facteur de transcription HIF-1. En effet, dans 90 % des ccRCC survient une altération du chromosome 3p, comprenant quatre des gènes les plus fréquemment mutés dans le cancer du rein : *VHL*, *PBRM1*, *BAP1 et SETD2* (Zbar, Brauch et al. 1987, Guo, Gui et al. 2011). Le niveau d'expression de *PBRM1*, sous-unité du complexe PBAF SWI/SNF intervenant dans le remodelage de la chromatine, de l'histone déubiquitinase BAP1 et de l'histone méthyltransférase SETD2 est retrouvé altéré dans 41%, 15% et 12% des ccRCCs respectivement (Cancer Genome Atlas Research 2013). L'inactivation du gène *VHL* peut être causée par délétion chromosomique, par mutation, mais également par méthylation de son promoteur (Herman, Latif et al. 1994). L'ensemble de ces données met en évidence le rôle clé de l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *VHL* dans la progression du ccRCC. Les ccRCC sont histologiquement prédominants dans les cancers rénaux engendrant des métastases. Cependant, le profil chromosomique des métastases des ccRCC est distinct de celui des tumeurs primitives. En effet, une étude réalisée en 2015 a montré que les métastases de tous

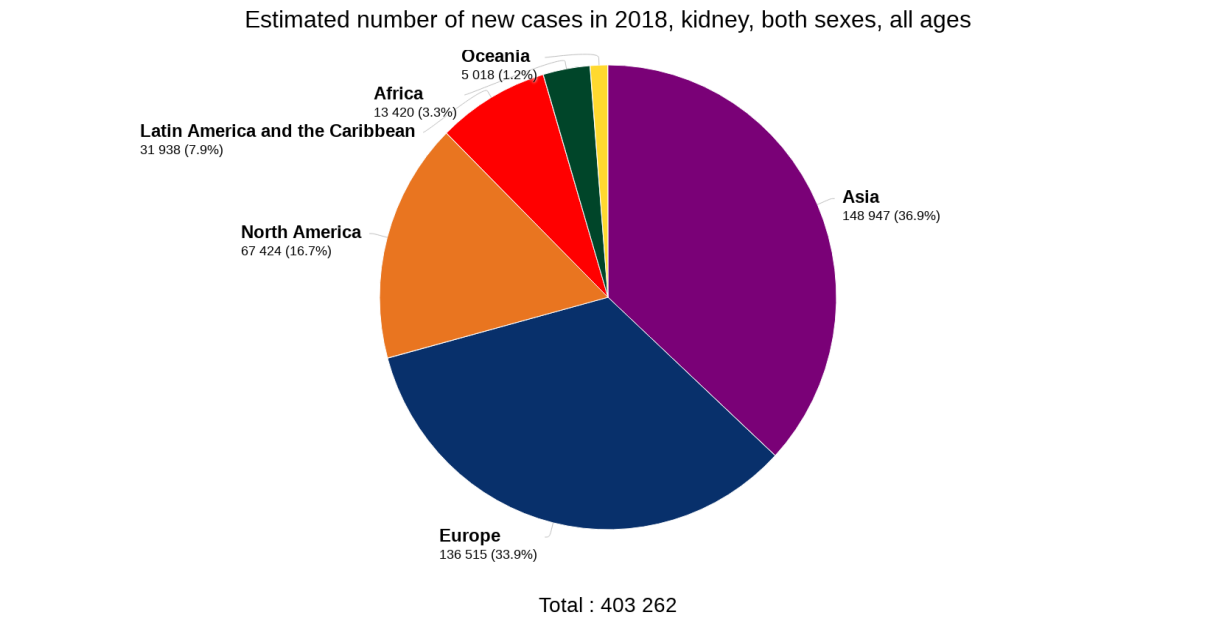
les patients avaient un gain en 3q22 (environ 1 Mb). Cette région contient des gènes (*PPP2R3A*, *STAG1*, *MSL2*, *NCK1*, *TMEM22*) qui pourraient être impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses et/ou la dissémination métastatique (Dagher 2015).

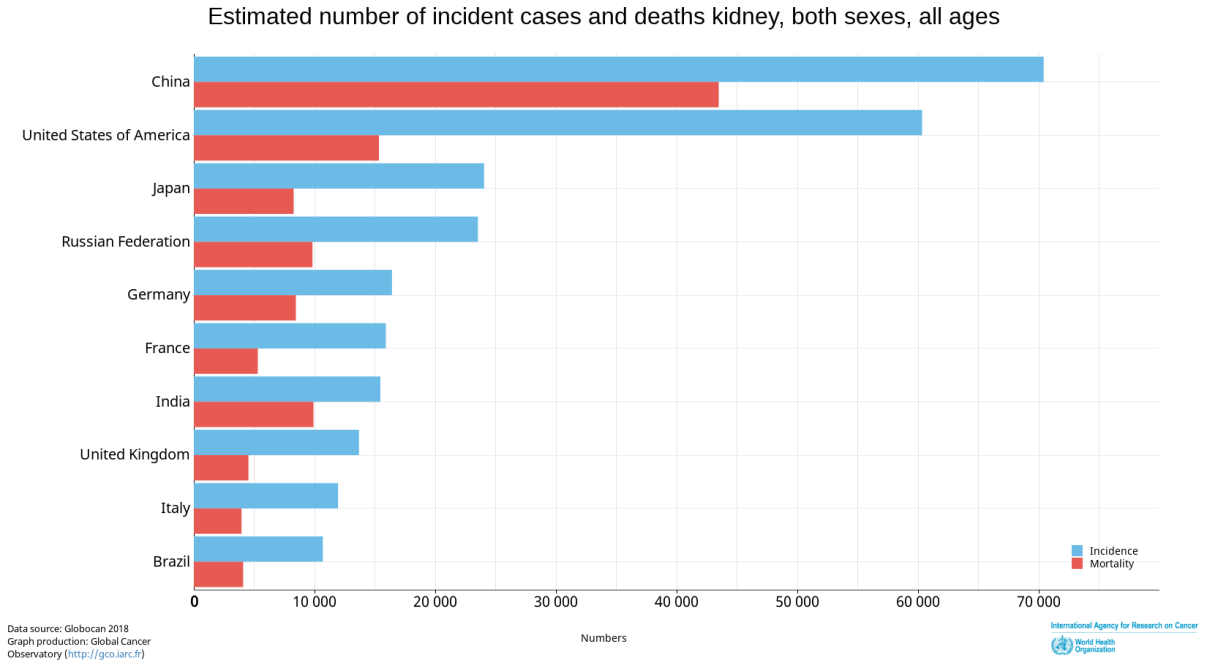
1.2 RCC papillaires

Les RCC papillaires sont généralement classés en deux types selon leur morphologie histologique. Les carcinomes papillaires de type I sont caractérisés par des cellules de petite taille au cytoplasme pâle, peu abondant avec un petit noyau sans nucléoles visibles et les carcinomes papillaires de type II caractérisés par des cellules de grande taille, au cytoplasme éosinophile avec un important noyau et de nombreux nucléoles (Delahunt and Eble 1997). La majorité des pRCC sont des cas sporadiques. Cependant, deux formes de prédispositions génétiques sont aujourd'hui bien identifiées. La première est le syndrome HPRCC (hereditary papillary RCC), caractérisé par le développement de multiples pRCC de type I. Ce syndrome est lié à la présence de mutations activatrices du proto-oncogène *MET*. Plusieurs mutations somatiques de *MET* ont été identifiées dans des carcinomes papillaires sporadiques (Schmidt, Duh et al. 1997). La deuxième forme est le syndrome HLRCC (hereditary leiomyomatosis and RCC), lié à des mutations germinales du gène *FH* (fumarate hydratase). Ce syndrome est caractérisé par des lésions cutanées et utérines de type léiomyomes et la survenue de pRCC de type II. Les mutations de *FH* ont été exclusivement identifiées dans les formes familiales de pRCC de type II (Linehan 2012, Menko, Maher et al. 2014).

1.3 RCC chromophobes

Le chRCC est une tumeur homogène bien délimitée et est le plus souvent associé à un stade et à un grade tumoral bas. Histologiquement, il existe deux variantes selon l'aspect du cytoplasme après coloration : la variante à cellules claires et celle à cellules éosinophiles. Les chRCC ont été associés au syndrome Birt-Hogg-Dubé (BHD), provoquant des lésions cutanées bénignes, des pneumothorax spontanés, des kystes pulmonaires et des RCC chromophobes dans 30 % des cas. Ce syndrome est lié à une mutation inactivatrice du gène *FLCN* codant pour la folliculine, hormone produite par l'ovaire (Schmidt, Warren et al. 2001, Nickerson, Warren et al. 2002, Pavlovich, Walther et al. 2002). Une autre étude réalisée en 2015 sur 66 échantillons de chRCC a montré une mutation du gène *TP53* dans 32% des cas. Ces mutations étaient associées à une diminution du niveau d'expression des gènes cibles de p53 (Davis, Ricketts et al. 2014).





<u>Figure I17</u> : Estimation de l'incidence du cancer du rein à travers le monde en 2018. La figure du haut illustre le nombre de cas de cancer du rein diagnostiqué en 2018 à travers le monde pour tout âge et sexe confondu. La figure du bas représente les 10 pays les plus touchés par le cancer du rein en termes d'incidence et de mortalité en 2018 pour tout âge et sexe confondus. (Organisation Mondiale de la Santé, BioScan)

2. *Incidence, facteurs de risque et symptômes cliniques*

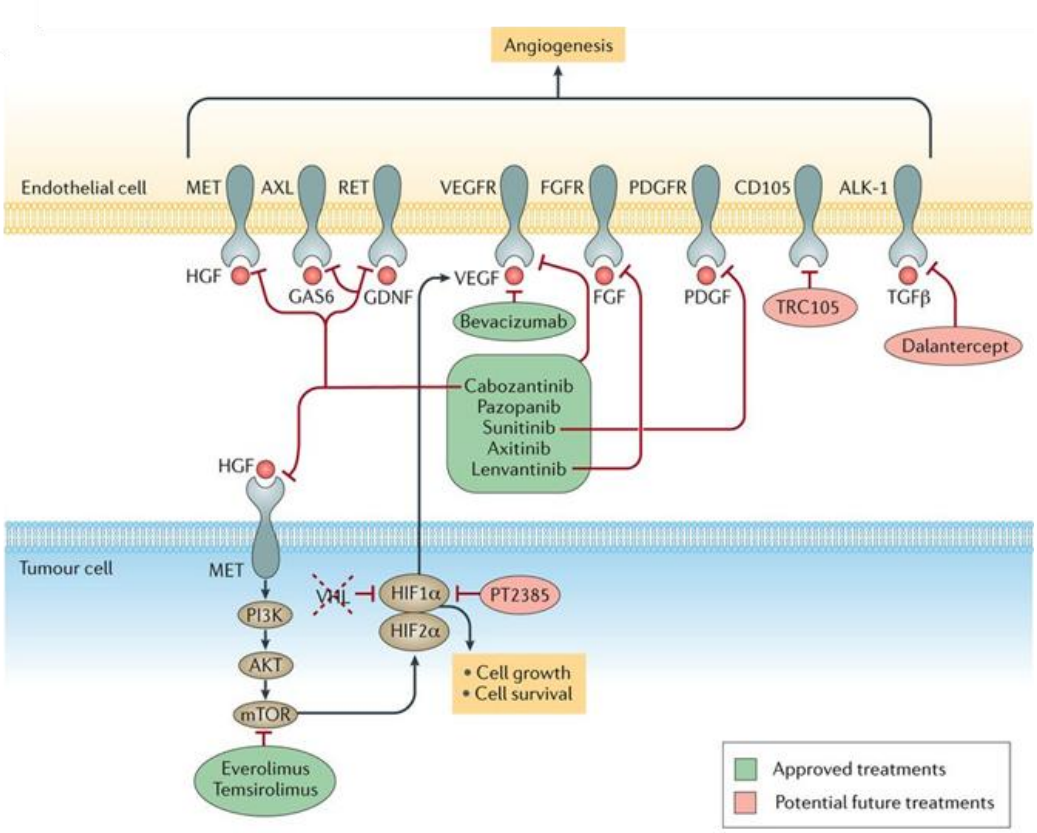
Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer du rein constitue le treizième cancer le plus diagnostiqué dans le monde avec 295 000 nouveaux cas et 134 000 décès chaque année. En 2018, le nombre estimé de nouveaux cas de cancer du rein à travers le monde est de plus de 400 000 (figure I17). L'incidence du cancer du rein est fortement corrélée avec l'âge. En effet, le cancer du rein peut apparaitre à tout âge, mais près de la moitié des patients diagnostiqués pour un cancer du rein sont âgés de plus de 50 ans, les hommes étant le plus touchés avec un ratio de 2/1 (Hsieh, Purdue et al. 2017). L'incidence du cancer du rein est en constante augmentation avec un impact plus important dans les pays développés que dans les pays en développement (Capitanio and Montorsi 2016). Cependant, le taux de mortalité associé à ce cancer s'est stabilisé ces dernières années et a même parfois diminué. Ce profil divergent entre l'incidence et la mortalité est certainement dû, dans les pays développés, au développement des techniques d'imagerie permettant un diagnostic plus précoce de la tumeur (Cairns 2010).

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés pour le cancer rénal. Les plus importants sont le tabagisme, l'obésité et l'hypertension. 2 à 4% des cancers rénaux sont héréditaires, de ce fait il existe des prédispositions génétiques au développement du cancer rénal. De plus, les individus présentant une maladie rénale chronique ou ayant subi une transplantation rénale sont également plus à risque de développer un cancer du rein (Cairns 2010).

Une tumeur du rein peut être présente très longtemps avant les premières manifestations cliniques. Par conséquent, il est souvent très difficile de diagnostiquer la maladie à un stade précoce. Lorsque les symptômes apparaissent, la tumeur s'est généralement bien développée entrainant alors la présence de sang dans les urines, une douleur dans la région des reins et la présence d'une masse palpable dans le ventre. Une des conséquences de la formation d'une tumeur du rein est la diminution de production d'hormones par ce dernier se manifestant par de la fièvre, une sensation générale d'apathie et une perte de poids inexpliquée. Cependant, ces symptômes sont non spécifiques et souvent mal attribués. Il arrive qu'une tumeur du rein ne soit découverte qu'accidentellement, à l'occasion d'un examen qui visait à détecter d'autres anomalies (Cairns 2010).

3. *Traitements*

Lorsqu'un patient est diagnostiqué pour un cancer du rein, le choix du traitement est guidé par le stade de la tumeur. Ce stade est établi sur la taille de la masse, sa position au sein de l'organe et l'atteinte des ganglions lymphatiques, première étape de la dissémination. Ainsi les tumeurs peuvent être classées en quatre grades : les tumeurs de stade I et II restreintes aux reins dont la taille n'excède pas 7 cm pour le stade I et 10 cm pour le stade II, les tumeurs de stade III qui



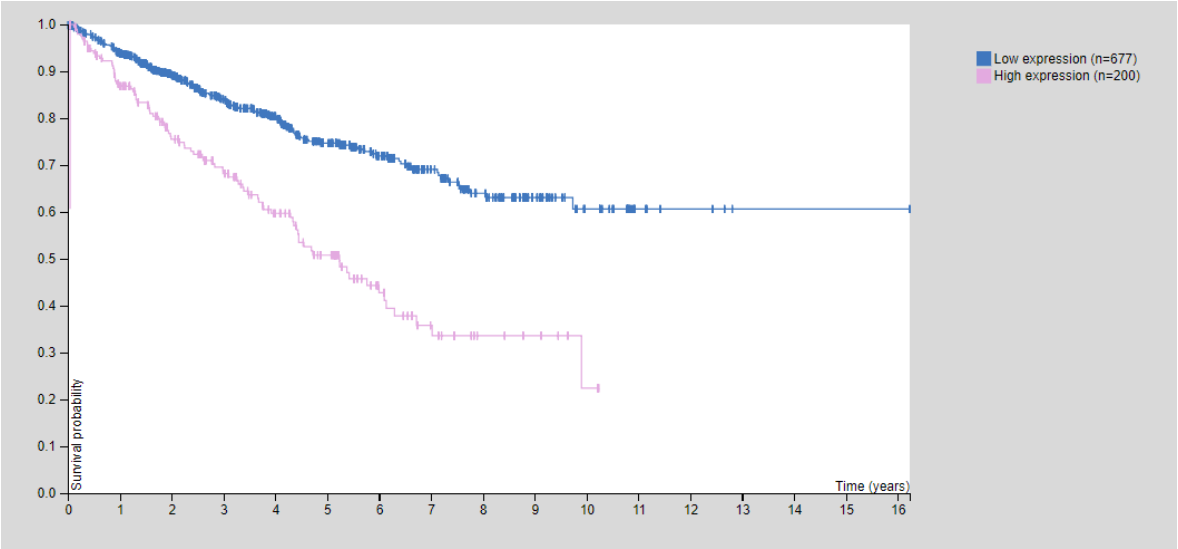
<u>Figure I18</u> : Cibles des agents chimiothérapeutiques utilisés dans le cancer du rein. Les agents pharmacologiques utilisés ou en développement dans le cas du cancer du rein ciblent principalement les kinases impliquées dans l'angiogenèse telles que VEGFR, FGFR et PDGFR dont l'expression est souvent dérégulée suite à la mutation du gène *pVHL* dans les cellules cancéreuses. (Posadas, Limvorasak et al. 2013)

s'étendent dans les veines principales et la glande surrénale et les tumeurs de stade IV qui métastasent au-delà de la glande surrénale (Hsieh, Purdue et al. 2017). Si la tumeur est localisée, la première voie de traitement est l'exérèse de la masse tumorale avec ablation partielle ou totale du rein. Cependant, si la tumeur est inopérable, un traitement systémique à base de chimiothérapie est mis en place.

Comme décrit précédemment, les ccRCC sont caractérisés par la mutation du gène *pVHL* engendrant des dérégulations importantes de la voie pVHL/HIF-1 et des modifications des voies de signalisation favorisant la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogenèse. Ces différentes voies de signalisation sont les cibles de la majorité des agents chimiothérapeutiques utilisés pour traiter les cancers du rein. C'est le cas des inhibiteurs de tyrosine kinase comme le sunitinib, le sorafenib, l'axitinib et le pazopanib ou encore des anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF (figure I18) (Posadas, Limvorasak et al. 2017).

Le sunitinib, principal agent chimiothérapeutique utilisé dans le cadre du cancer du rein, inhibe plusieurs récepteurs à tyrosine kinase (RTK) impliqués dans la croissance tumorale, la néo-angiogenèse pathologique et la progression métastatique du cancer. En effet, ces enzymes ont un rôle critique dans l'activation et l'inhibition de nombreuses voies de signalisation. Suite à la liaison d'un ligand, les tyrosine kinases réceptrices se dimérisent entrainant l'autophosphorylation de leur domaine cytoplasmique et l'activation de leur domaine kinase. Leur activation induit la transduction de signaux favorisant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la formation de métastases et la survie cellulaire dans un grand nombre de cancers (Vlahovic and Crawford 2003). De ce fait, les tyrosine kinases représentent des cibles clés pour les traitements anti-cancéreux. Le sunitinib a été identifié comme un inhibiteur des récepteurs du facteur de croissance plaquettaire (PDGFRα et PDGFRß), des récepteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3) et du récepteur du facteur de cellule souche (KIT) (Vazquez, Leon et al. 2012). A la vue de ces cibles, cet agent chimiothérapeutique inhibe la prolifération cellulaire exerçant ainsi une action cytostatique et non cytotoxique.

HIF-1 peut également être régulé par la protéine mTOR via une voie indépendante de pVHL. La voie de signalisation mTOR étant impliquée dans la progression des RCC (Lieberthal and Levine 2009) constitue une cible thérapeutique intéressante. Dans ce but, une inhibition de la protéine mTOR par la rapamycine, le temsirolimus ou l'everolimus permet de cibler la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Thomas, Tran et al. 2006, Battelli and Cho 2011, Ghidini, Petrelli et al. 2017). Outre le gène *pVHL*, trois autres gènes sont retrouvés mutés dans au moins 10% des cas de ccRCC : *PBRM1, BAP1 et SETD2*. Depuis peu, de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les voies régulées par les produits de ces différents gènes sont développées (Brugarolas 2013).



<u>Figure I19</u> : Courbe de survie Kaplan Meier pour le cancer du rein suivant le niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A. Cette courbe a été réalisée grâce à l'étude du niveau d'expression de TMEM45A chez 286 femmes et 591 hommes atteints de cancer du rein. Le taux de survie moyen après 5 ans des patients montrant une forte expression de TMEM45A est de 51% contre 75% dans le cas des patients montrant un faible niveau d'expression de TMEM45A ($p=6{,}2.10^{e\text{-}11}$). (The Humain Protein Atlas)

4. *Le cancer rénal et TMEM45A*

Le ccRCC est principalement caractérisé par la mutation du gène *pVHL* entrainant une stabilisation du facteur de transcription HIF-1. La stabilisation de ce facteur mène à une activation de la transcription de ces gènes cibles conférant un état de pseudo-hypoxie aux cellules cancéreuses. Dès lors, il n'est pas surprenant de retrouver une surexpression du gène *TMEM45A*, cible de HIF-1 dans les cellules de ccRCC. Il a notamment été montré que *TMEM45A* était surexprimé dans les ccRCC de haut stade. En effet, afin d'identifier les gènes impliqués dans la progression des ccRCC, une analyse transcriptomique a été réalisée dans des tissus tumoraux de différents stades en comparaison à des tissus sains. Parmi les gènes les plus différentiellement exprimés entre les tissus tumoraux et tissus sains, 143 gènes étaient différentiellement dérégulés entre les tumeurs de stade précoce et les tumeurs de haut stade. *TMEM45A* a alors était identifié comme étant le gène dont l'expression est la plus fortement modulée entre les ccRCC de stade précoce et les ccRCC de haut stade (Wrzesinski, Szelag et al. 2015, Thibodeau, Fulton et al. 2016). De plus, des données référencées dans la base de données The Human Protein Atlas, mettent en évidence que TMEM45A serait un marqueur de mauvais pronostic chez les patients atteins d'un cancer du rein (figure I19). Ces résultats suggèrent que TMEM45A pourrait avoir un rôle important dans la progression des ccRCC.

5. *Modèle cellulaire*

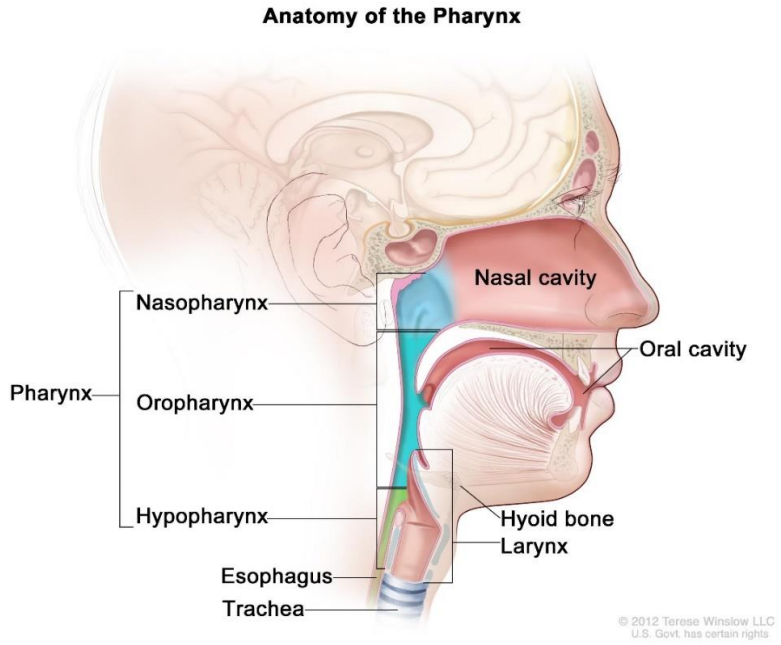
L'établissement de lignées cellulaires immortelles est crucial pour l'étude du développement tumoral et de la réponse aux thérapies. Idéalement, une lignée cellulaire doit posséder l'ensemble des caractéristiques génétiques qui définissent le type ou sous-type de cancer dont elle est issue. Cependant, de nombreuses études ont révélé une dérive génétique des lignées cellulaires utilisées pour les analyses *in vitro* avec des différences moléculaires entre les lignées cellulaires et les échantillons de tumeurs de patients (Sinha, Winer et al. 2017, Atala 2018).

Le nombre de lignées cellulaires de cancer du rein est important : plus de 20 lignées sont disponibles dans des banques de cellules et des dizaines ont été établies et utilisées au sein de laboratoires de recherche (Brodaczewska, Szczylik et al. 2016). En 2017, une étude réalisée par Sinha et al a permis de caractériser les lignées cellulaires commerciales de carcinome rénal et ainsi d'identifier les différences et les ressemblances existant entre les lignées cellulaires établies et les sous-groupes de RCC, les ccRCC, les pRCC et les chRCC. Les résultats indiquent que les lignées cellulaires utilisées possèdent des caractéristiques correspondant aux formes agressives de cancer du rein. La lignée 786-O possède de nombreuses caractéristiques des ccRCC et est communément utilisée dans la recherche du cancer du rein. Cette lignée cellulaire présente une mutation du gène *pVHL*. Cependant dans cette lignée, la perte de fonction du gène *pVHL* ne conduit pas à une augmentation de l'expression des gènes cibles de HIF équivalente

à celle observée lors d'une exposition à l'hypoxie (Jiang, Zhang et al. 2003). La lignée Caki-1 est quant à elle utilisée comme modèle de ccRCC métastatique (Lichner, Saleh et al. 2015). Une autre lignée cellulaire intéressante est la lignée RCC4. Cette lignée mutée pour le gène *pVHL*, RCC4 plus vector alone, est la seule à être également commercialisée avec une restauration stable du gène *pVHL* sauvage, RCC4 plus *pVHL*. Ainsi c'est un bon modèle pour l'étude des mécanismes dépendant de *pVHL* au sein du cancer du rein. Etant tumorigène chez la souris, cette lignée est utilisée dans le cadre d'études *in vitro* et *in vivo*. A la vue de l'implication de la protéine pVHL dans la régulation de HIF et donc de TMEM45A, nous avons décidé d'utiliser cette lignée comme modèle du cancer rénal pour nos travaux (Brodaczewska, Szczylik et al. 2016).

Conclusion

Malgré le développement de nouveaux agents thérapeutiques, de nombreux patients développent une résistance à ces traitements. De plus, la majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie. Dès lors, l'identification de nouveaux marqueurs et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires. TMEM45A étant visiblement un marqueur de mauvais pronostic du cancer du rein, dont le niveau d'expression est associé à un haut stade de la maladie, cette protéine pourrait être impliquée dans l'agressivité tumoral et la réponse aux traitements du cancer rénal.



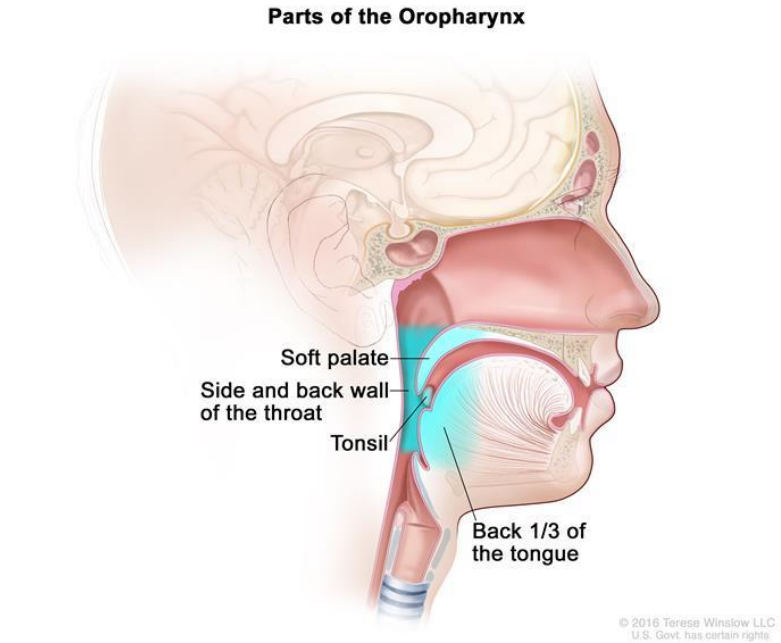


Figure I20 : Anatomie de la sphère ORL. Représentation schématique de la cavité nasale, la cavité buccale, du larynx et du pharynx comprenant le nasopharynx, l'oropharynx et l'hypopharynx. L'oropharynx comprend lui-même les tonsilles (dont les tonsilles palatines ou amygdales), la luette, le voile du palais et la base de la langue. (https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/adult/oropharyngeal-treatment-pdq)

Chapitre 5 : Cancer ORL

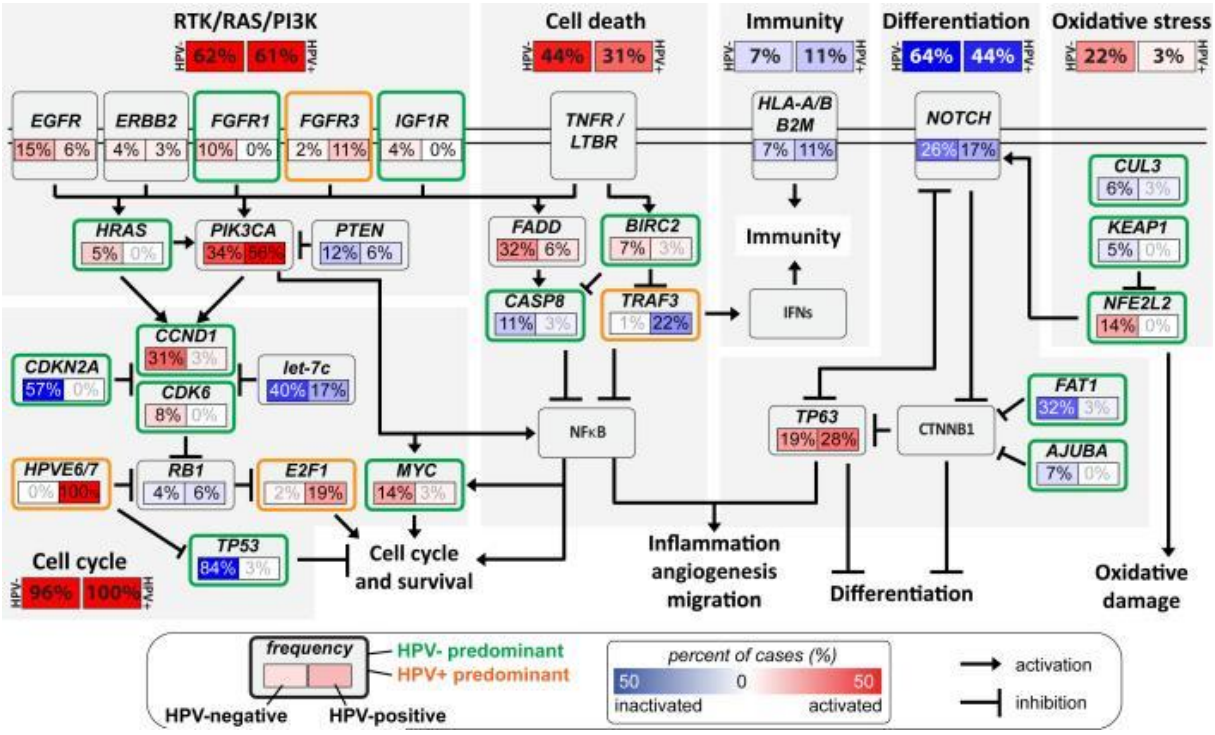
La cavité orale, aussi appelée cavité buccale, représente le premier segment du tube digestif. Elle est divisée en deux parties : le vestibule et la cavité buccale proprement dite qui sont séparés par l'arcade dentaire. Au fond de cette cavité orale se trouve le pharynx, carrefour entre les voies respiratoires et digestives. Le pharynx intervient dans le système digestif favorisant le passage des aliments de la bouche vers l'œsophage, le système respiratoire permettant le passage de l'air vers le larynx, l'audition en reliant l'ouverture de la trompe d'eustache à l'oreille interne et la phonation en modifiant les sons produits dans le larynx par les cordes vocales.

Le pharynx est subdivisé en trois parties : le nasopharynx, l'oropharynx et l'hypopharynx. Dans son ensemble, le pharynx possède une forme d'entonnoir d'environ 13 cm de long. Son diamètre varie de 5 cm en position nasale, 4 cm en position orale et 2 cm en position laryngée. Il est composé d'une muqueuse, d'un tissu conjonctif, de muscles constricteurs et élévateurs du pharynx et d'une membrane fibro-élastique bucco-pharyngienne. Entre le pharynx et la trachée se trouve le larynx, organe cartilagineux impliqué dans le passage de l'air vers les poumons lors de l'inspiration, ou vers l'extérieur lors de l'expiration. Le larynx, comprenant les cordes vocales, possède également un rôle dans la phonation (figure I20).

Les cancers ORL (Oto-Rhino-Laryngologie), aussi appelés cancers des voies aérodigestives supérieures, regroupent les cancers de la cavité buccale, du larynx et du pharynx comprenant l'hypopharynx, l'oropharynx et le nasopharynx. Dans le cas des cancers du larynx, les tumeurs se développent généralement au niveau des cordes vocales. Les cancers de la sphère ORL se composent majoritairement de carcinomes épidermoïdes. D'un point de vue histologique, il s'agit le plus souvent d'épithéliomes malpighiens. L'épithélium malpighien est un type de tissu fondamental dont les cellules sont de forme pavimenteuse et stratifiée. Il en existe deux formes : l'épithélium malpighien kératinisé, généralement localisé au niveau de l'épiderme et l'épithélium malpighien non kératinisé que l'on retrouve par exemple au niveau de la cavité orale. Dans le cas de cancers touchant la base de la langue, il s'agit en règle générale d'un carcinome épidermoïde bien différencié infiltrant. Le mauvais pronostic de cette lésion est lié au caractère le plus souvent mal limité de la tumeur infiltrant la musculature linguale. Cependant, l'ensemble des tumeurs ORL ont de nombreux points communs sur les plans histologique, épidémiologique, évolutif et thérapeutique.

1. Classification et caractéristiques des cancers ORL

Dans le but d'améliorer la prise en charge et la classification des cancers ORL, des études ont essayé d'identifier les altérations génétiques des cancers de la tête et du cou. A ce jour, un des



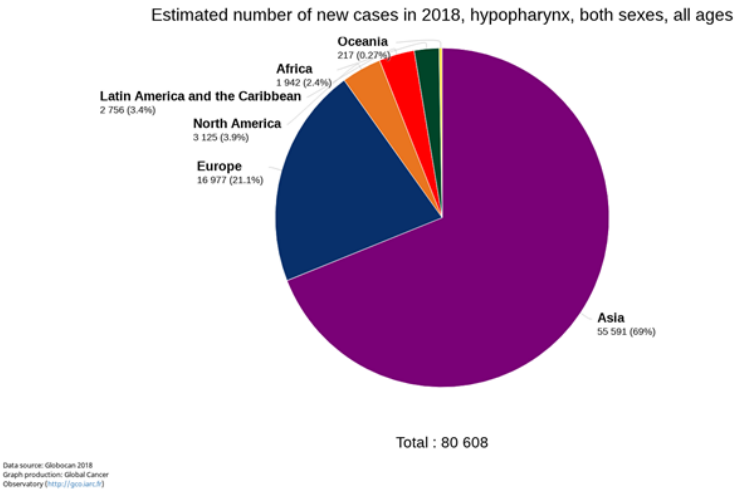
<u>Figure I21</u> : Représentation des mutations et des voies de signalisation altérées dans les cancers ORL. De nombreuses voies de signalisation sont retrouvées dérégulées dans les cancers de la tête et du cou. Les trois voies les plus altérées sont le cycle cellulaire et la voie RTK/RAS/PI3K, voies mutées à la fois dans les tumeurs HPV négatives et HPV positives, et la voie de mort cellulaire, principalement altérée dans les tumeurs HPV négatives via une mutation des gènes codant *BIRC2* et *caspase 8*. (Seiwert, Zuo et al. 2015)

critères majeurs de classification des cancers ORL est le statut d'infection au papillomavirus humain (HPV). En 1983, des chercheurs ont mis en évidence des preuves d'une infection au HPV dans des échantillons de carcinomes oropharyngés (Syrjanen, Pyrhonen et al. 1983). Depuis lors, le virus HPV a été identifié comme une des causes du développement de cancer ORL. Depuis ces 15 dernières années, l'incidence de cancers ORL HPV positifs ne cesse d'augmenter avec 60% des cancers oropharyngés HPV positifs (Pytynia, Dahlstrom et al. 2014, Cancer Genome Atlas 2015). Les tumeurs HPV positives ou HPV négatives ont des profils d'altérations génomiques spécifiques, mais également des impacts différents sur le patient en termes de survie, de réponse au traitement ou de rechute. Les principales mutations retrouvées dans les cancers ORL sont des mutations de gènes suppresseurs de tumeur comme *TP53*, *CDKN2A* et *PTEN*, de gènes impliqués dans la différenciation des cellules épidermiques tels que *NOTCH1* ou *TP63* mais également des proto-oncogène incluant *HRAS* et *PIK3CA*. Des mutations inactivatrices ont également été identifiées dans le gène de la *caspase 8* (Gaykalova, Mambo et al. 2014, Cancer Genome Atlas 2015) (Seiwert, Zuo et al. 2015). L'ensemble de ces mutations est repris dans la figure I21. Près de la moitié des mutations du gène *NOTCH1* sont prédites pour induire la production d'une forme tronquée de la protéine, suggérant que *NOTCH1* pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur dans ces cancers (Agrawal, Frederick et al. 2011).

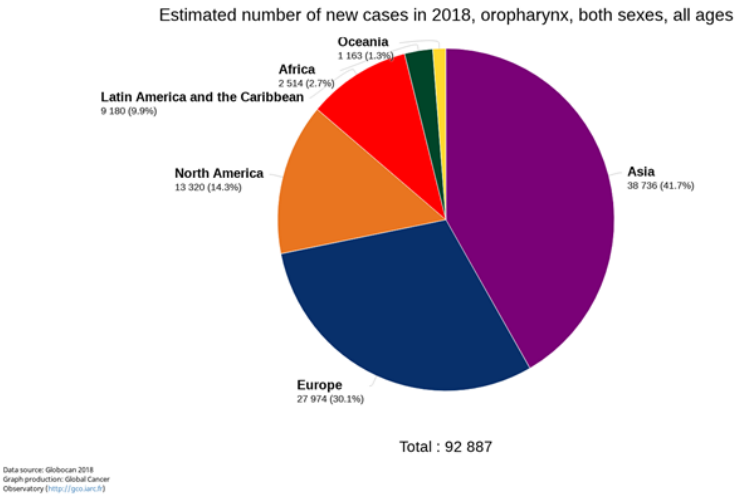
La voie de signalisation la plus dérégulée dans le cas des cancers HPV positifs est la voie PI3K avec en plus d'une altération de PIK3CA des mutations dans les gènes *PTEN* (15%), *AKT1* (5%), *RICTOR* (4%), *mTOR* (2%), *AKT2* (2%) et *PIK3R1* (2%). L'inactivation de p53, retrouvée à la fois dans les tumeurs HPV positives et HPV négatives, est réalisée par des mécanismes distincts entre les deux catégories de tumeurs. En effet, alors que cette protéine est inactivée par les protéines virales E6 et E7 dans les cancers HPV positifs, elle est retrouvée mutée dans les cancers HPV négatifs (Parfenov, Pedamallu et al. 2014). p53 est d'ailleurs la protéine dont le taux de mutation est le plus haut, puisqu'elle est retrouvée mutée dans plus de 70% des cas de cancers HPV négatifs (Chang, Syrjanen et al. 1994, Chung, Guthrie et al. 2015). Les tumeurs HPV positives sont plus petites et peu différenciées et sont associées à un plus haut risque de dissémination métastatique que les tumeurs HPV négatives. Cependant, de manière surprenante, le taux de survie des patients atteints d'un cancer ORL HPV positif est plus important que les patients atteints d'un cancer ORL HPV négatif (Fakhry and Gillison 2006). Le statut d'infection des cancers ORL est donc utilisé comme marqueur de pronostic et de réponse aux traitements (Spence, Bruce et al. 2016).

Une autre caractéristique majeure des cancers ORL est une surexpression de l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) et de son ligand le TGF-α. En effet, l'EGFR est surexprimé dans 90% des patients atteints de cancer de la tête et du cou (Grandis and Tweardy 1993). L'EGFR fait partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase HER (ErbB) incluant l'EGFR (HER1/ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) et HER4 (ErbB-4) (Yarden and Sliwkowski 2001). La fixation du TGF-α sur son récepteur entraine la dimérisation de ce

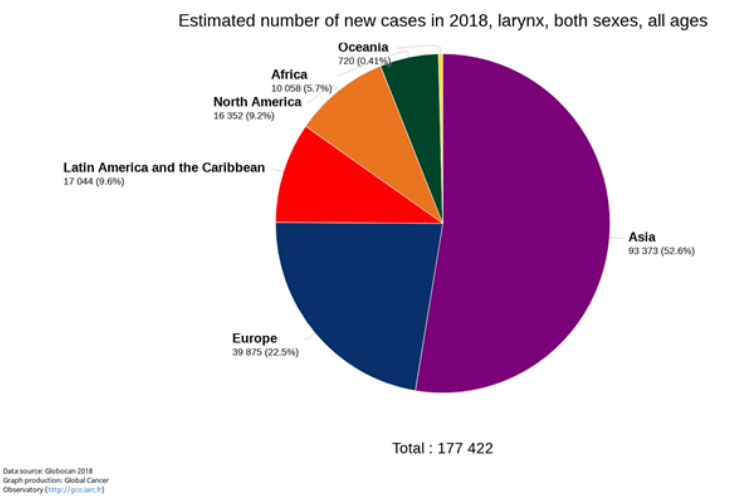
A



B

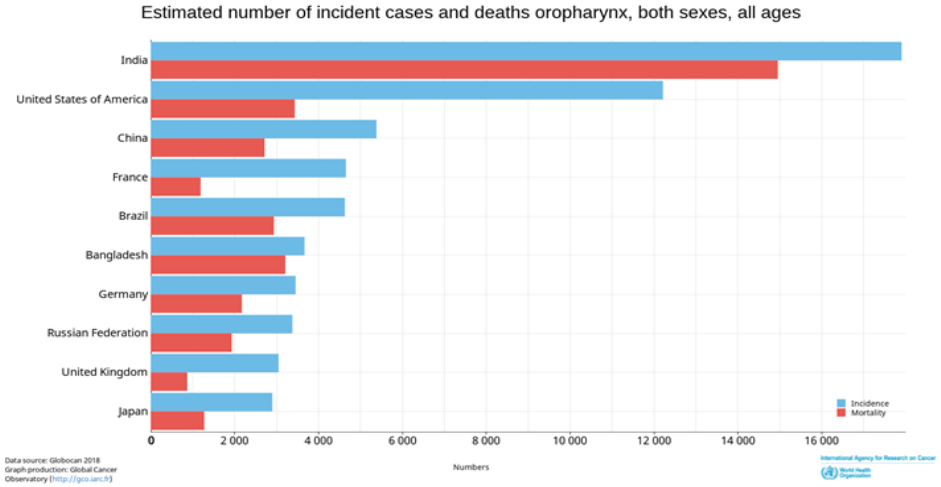


C

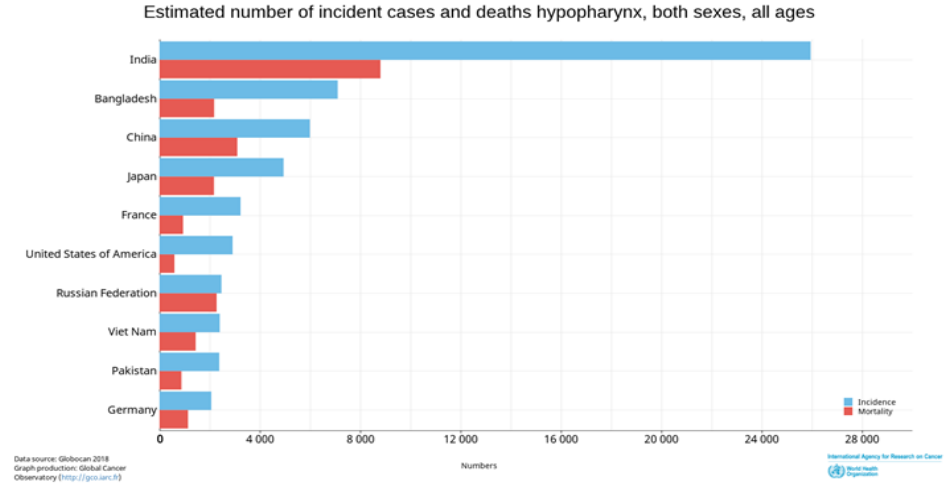


<u>Figure I22</u> : Estimation de l'incidence des cancers ORL à travers le monde en 2018. Les différents diagrammes illustrent le nombre de cas de cancer de (A) l'hypopharynx, (B) l'oropharynx et (C) larynx diagnostiqués en 2018 à travers le monde pour tout âge et sexe confondu. (Organisation mondiale de la santé, BioScan)

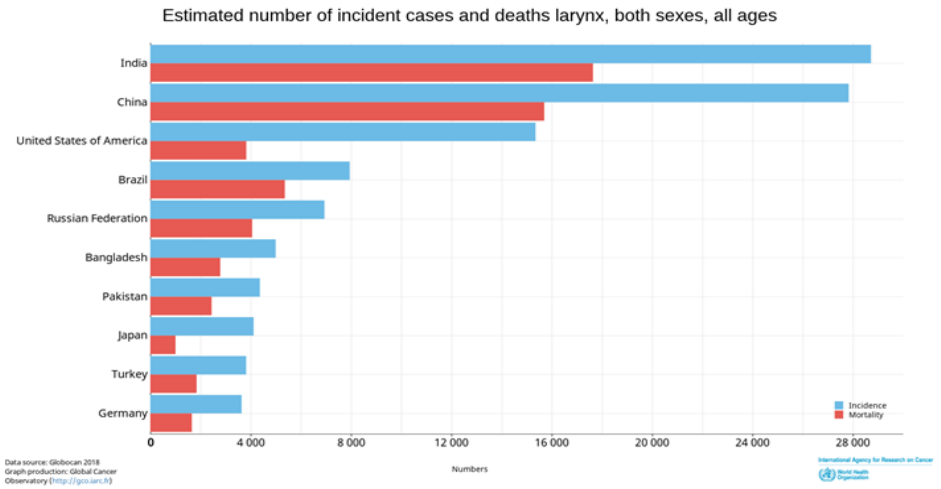
A



B



C



<u>Figure I23</u> : Estimation de l'incidence et du taux de mortalité des cancers ORL en 2018. Les figures représentent les 10 pays les plus touchés par le cancer de (A) l'hypopharynx, (B) l'oropharynx et (C) larynx en termes d'incidence et de mortalité en 2018 pour tout âge et sexe confondu. (Organisation Mondiale de la Santé, BioScan)

Tumeur T		
TX	Tumeur primitive non évaluable	
T0	Tumeur non détectable	
Tis	Carcinome *in situ*	
T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension	
T2	Tumeur dont la plus grande dimension est >2 cm et ≤ 4 cm	
T3	Tumeur dont la plus grande dimension est >4 cm ou extension à la surface linguale de l'épiglotte	
T4	**T4a**	tumeur envahissant une des structures suivantes : larynx, musculature profonde/extrinsèque de la langue (génioglosse, hyoglosse, palatoglosse et styloglosse), muscle ptérygoïdien médian, palais osseux et la mandibule*
	T4b	tumeur envahissant une des structures suivantes : muscle ptérygoïdien latéral, apophyses ptérygoïdes, paroi latérale du nasopharynx, base du crâne ; ou englobant l'artère carotide
Ganglions N		
N0	Pas de signe d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux	
N1	Métastase dans un seul ganglion lymphatique homolatéral ≤ à 3 cm dans sa plus grande dimension	
N2	Métastases telles que :	
	N2a	métastase dans un seul ganglion lymphatique homolatéral >3 cm mais ≤ 6 cm
	N2b	métastases homolatérales multiples toutes ≤ 6 cm
	N2c	métastases bilatérales ou controlatérales ≤ 6 cm
N3	Métastase dans un ganglion lymphatique >6 cm dans sa plus grande dimension	
Métastase M		
M0	Pas de métastase à distance	
M1	Présence de métastase(s) à distance	

Figure I24 : Classification clinique des cancers ORL. (http://oncologik.fr/referentiels/oncolor/carcinome-epidermoide-de-l-oropharynx)

dernier et l'activation de voies de signalisation incluant les voies Ras/Raf/MAPKs (Suzuki 2002), PI3K/Akt (Vivanco and Sawyers 2002) et PLC/PKC impliquées dans la prolifération cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et la survie cellulaire (Huang and Harari 2000, Chen and Nirodi 2007). La surexpression de l'EGFR augmente au cours de la cancérogenèse (Rubin Grandis, Melhem et al. 1996). De plus, son expression a été corrélée à un mauvais pronostic et une résistance aux radiothérapies dans divers cancers et en particulier les cancers ORL (Zimmermann, Zouhair et al. 2006, Nijkamp, Span et al. 2013). Dès lors, de nouvelles thérapies ciblant la voie EGFR/TGF-α ont été développées (Huang, Bock et al. 1999, Agulnik 2012).

2. *Incidence, facteurs de risque et symptômes cliniques*

Le cancer de la tête et du cou est le sixième cancer le plus fréquent. Chaque année, plus de 600 000 cas sont diagnostiqués à travers le monde (Ferlay, Shin et al. 2010). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le pays le plus touché par les cancers du pharynx et du larynx est l'Inde (figures I22 et I23). Malgré la mise en place de traitements, le taux de survie après 5 ans reste seulement de 50%. La réponse aux traitements et la rémission des patients dépendent étroitement du type de cancer ORL développé, mais également du stade de la tumeur. Les différents stades sont repris dans la figure I24. Les patients atteints d'une tumeur de stade I ou II possèdent 60 à 95% de chance de répondre positivement au traitement. Cependant, au moment du diagnostic, les tumeurs sont généralement déjà à un stade avancé (III ou IV) (Worsham 2011). Le taux de rechute après 2 ans est de 50% (Argiris, Karamouzis et al. 2008) et les patients présentant une rechute après un premier traitement ont une durée de vie moyenne estimée à 1 an (Vermorken, Mesia et al. 2008).

De nombreux facteurs de risque ont été identifiés dans le cas des cancers de la tête et du cou. Les deux plus importants sont la consommation de tabac et d'alcool. En effet, 85% des cancers développés dans la sphère ORL sont liés au tabac (cigarettes, cigares et pipes). De plus, le tabac affecte le pronostic ainsi que les chances de rémission. La consommation d'alcool a, quant à elle, un impact sur le développement de cancer de la bouche, du pharynx, du larynx et de l'œsophage. Ces deux facteurs de risque possèdent un effet synergique s'ils sont présents tous les deux. Un risque professionnel accru est également présent dans les métiers qui exposent le travailleur à l'inhalation de poussières (poussières de bois, d'amiante, etc.) ou de substances toxiques (dérivés du nickel, vapeurs d'acide sulfurique, hydrocarbures, peintures, etc.). D'autres facteurs de risque existent comme une infection avec le HPV, l'âge et le genre. En effet, au-delà de 40 ans, le risque de développer un cancer ORL augmente avec une incidence deux à trois fois plus importante chez les hommes que chez les femmes même si le taux de cancers de la tête et du cou a augmenté ces dernières années chez les femmes. De plus, une

exposition au HPV augmente le risque de développer un cancer ORL chez des individus jeunes qui ne consomment ni tabac ni alcool (Fakhry and Gillison 2006).

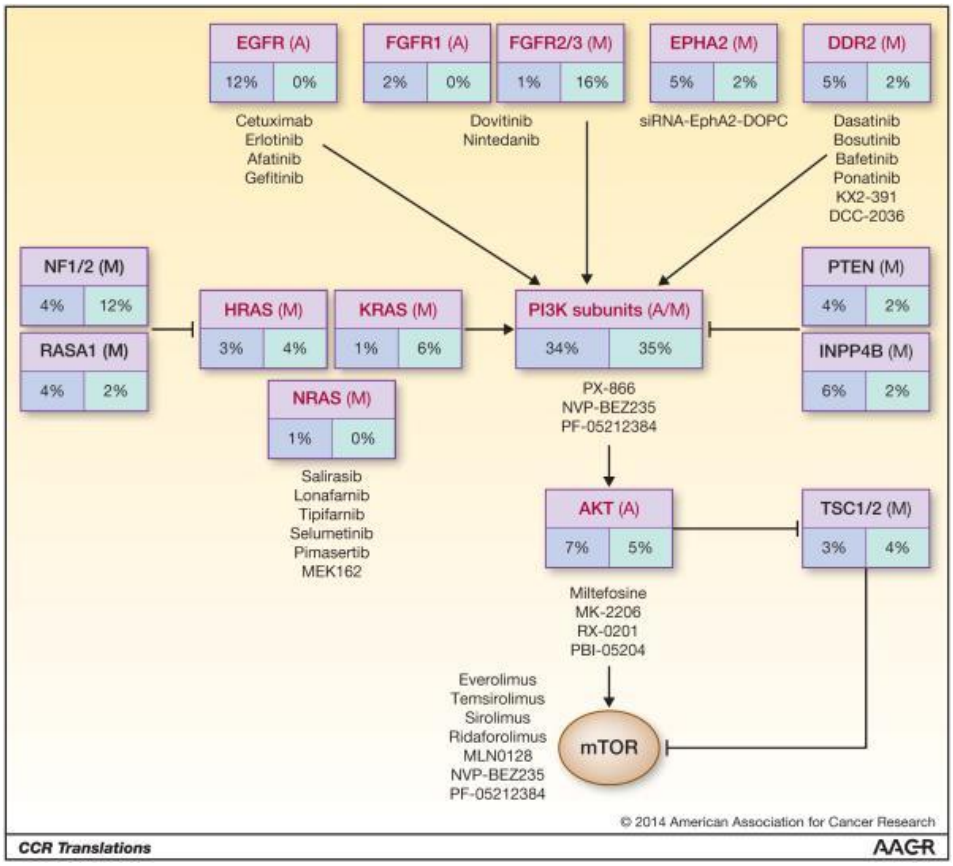
Les premiers symptômes sont souvent tardifs, discrets et confondus avec une irritation de la gorge typique des fumeurs. Ils comprennent une gêne ou une douleur de la gorge unilatérale, une sensation de présence d'un corps étranger, une difficulté à déglutir et l'apparition d'un ganglion au niveau de la mâchoire ou du cou. Il n'existe pas de dépistage systématique du cancer de la tête et du cou. Le diagnostic est établi à l'aide de plusieurs examens : une endoscopie des voies aériennes et digestives supérieures, une biopsie pour un examen microscopique et un scanner de la gorge pour confirmer le diagnostic. La biopsie renseignera sur le caractère plus ou moins différencié de la tumeur.

3. Traitements

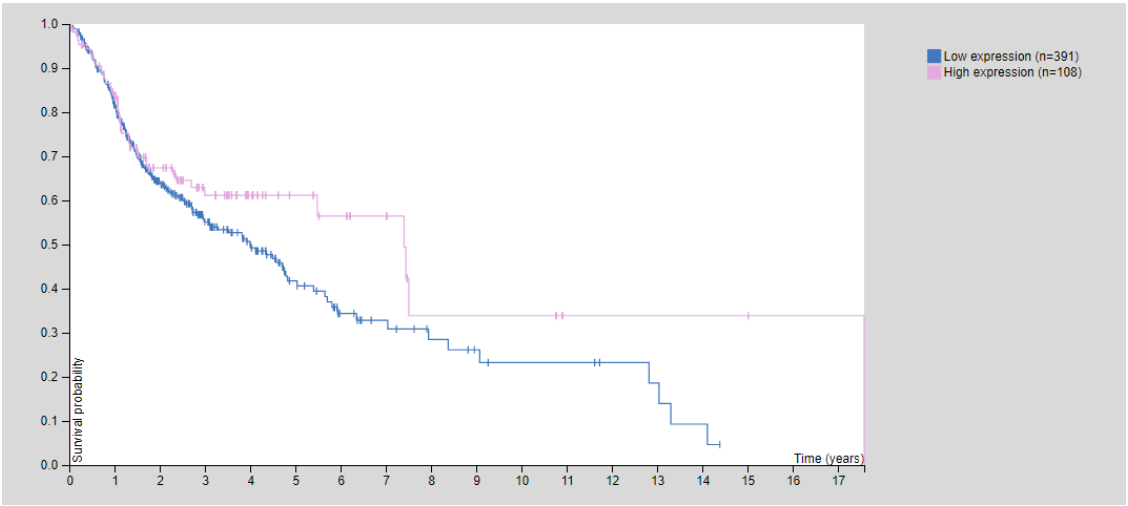
Suivant la taille, le stade et la localisation de la tumeur, les modalités de traitements proposées aux patients diffèrent. Le choix entre les différentes options tient compte à la fois de leur efficacité et de leurs conséquences fonctionnelles pour le patient.

Les tumeurs de stade I et II sont traitées soit par chirurgie, soit par radiothérapie. Le choix entre chirurgie et radiothérapie fait suite à une discussion multidisciplinaire au cours de laquelle le chirurgien et le spécialiste en radiothérapie définissent, avec l'aide des experts qui ont identifié les caractéristiques du cancer (sa taille, son agressivité…), l'approche la plus appropriée. Les techniques de radiothérapie ont été améliorées ces dernières années permettant de réduire les effets secondaires du traitement notamment l'irradiation des tissus sains adjacents et d'améliorer le confort de vie des patients. En effet, la tomothérapie, technique de radiothérapie guidée par l'image, permet aujourd'hui d'irradier la tumeur avec une grande précision, ce qui permet le recours à des doses très élevées pour traiter le cancer tout en préservant les tissus sains avoisinants.

Les cancers plus avancés requièrent généralement un traitement combiné par chirurgie et radiothérapie. Toutefois, il arrive fréquemment que la radiothérapie soit couplée à la chimiothérapie ou à l'administration de médicaments capables de cibler de manière spécifique la tumeur. Ces associations visent à augmenter l'efficacité de la radiothérapie. Ainsi, lorsqu'un patient présente une masse non opérable, le premier choix de traitement sera la radiothérapie couplée à la chimiothérapie dont le cisplatine. Ce traitement s'applique également si une préservation de l'organe est désirée, même si la masse peut être éliminée par chirurgie. En cas de rechute, le traitement est uniquement médicamenteux, il associe le cisplatine, le 5-fluorouracyl (5-FU) et le cétuximab (Erbitux) en premier lieu (Vermorken and Specenier 2010). Le cétuximab, ou C225, est un anticorps monoclonal ciblant le récepteur aux facteurs de croissance EGFR, surexprimé dans une majorité de tumeurs ORL. Un autre inhibiteur des récepteurs tyrosine kinases de la famille ErbB utilisé en chimiothérapie est l'Afatinib.



<u>Figure I25</u> : Agents thérapeutiques utilisés ou en développement pour lutter contre le cancer de la tête et du cou. Divers agents pharmacologiques ciblent les voies de signalisation altérées dans les cancers ORL telles que présentées dans la figure I21. En rouge figurent les oncogènes et en noir les gènes suppresseurs de tumeur. Les boites bleues représentent les cancers HPV négatifs et les boites vertes les cancers HPV positifs. A : amplification et M : mutation. (Krigsfeld and Chung 2015)



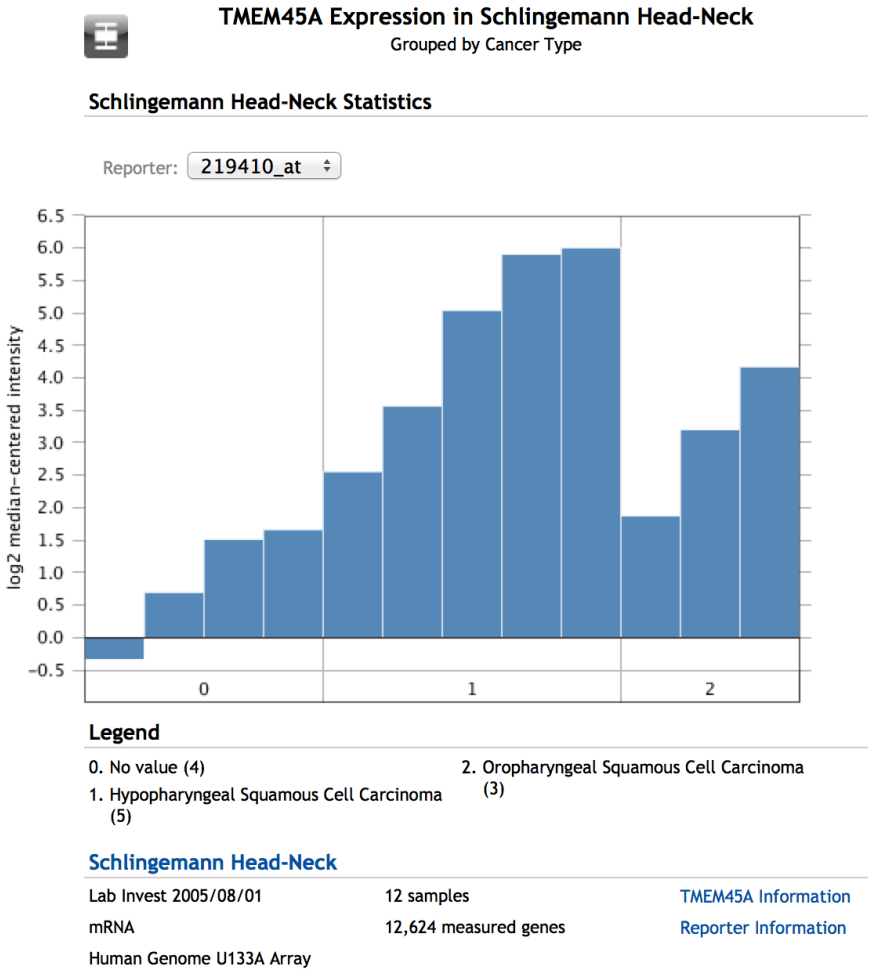
<u>Figure I26</u> : Courbe de survie Kaplan Meier pour le cancer ORL suivant le niveau d'expression de TMEM45A. Cette courbe a été réalisée grâce à l'étude du niveau d'expression de TMEM45A chez 133 femmes et 366 hommes atteints de cancer ORL. Le taux de survie moyen après 5 ans des patients montrant une forte expression de TMEM45A est de 61% contre 42% dans le cas des patients montrant un faible niveau d'expression de TMEM45A (p=0,14). (The Humain Protein Atlas)

Des études ont montré que l'Afatinib, couplé à la radiothérapie et/ou à d'autres agents chimiothérapeutiques pourrait augmenter l'efficacité du traitement (Seiwert, Fayette et al. 2014, Brands, Muller-Richter et al. 2016, Macha, Rachagani et al. 2017). Il a été mis en évidence qu'un traitement au cisplatine suivi par une exposition à l'Afatinib aurait un effet cytotoxique plus important que la cinétique inverse ou qu'une administration simultanée des deux molécules (Longton, Schmit et al. 2018). D'autres agents thérapeutiques ciblant les voies de signalisation dérégulées dans les cancers ORL présentées par Seiwert et al en 2015 ont également été développés (figure I25) (Krigsfeld and Chung 2015).

Les récentes avancées dans la compréhension de l'interaction entre le système immunitaire et la tumeur ont permis le développement d'immunothérapies qui révolutionnent le traitement de certains cancers, dont les cancers ORL. Au cours du déroulement de la réponse immunitaire, des points de contrôle sont mis en place afin d'assurer un équilibre entre l'activation et l'inhibition des lymphocytes T. Cependant, les cellules cancéreuses sont capables d'échapper au système immunitaire notamment en inhibant l'activité cytotoxique ou l'activation des lymphocytes T. Ces voies font appel au récepteur PD1 et à son ligand PDL1 ou au récepteur CTLA4. Ainsi deux types d'inhibiteurs ciblant ces deux voies ont été développés pour bloquer l'inhibition des lymphocytes T dans le cadre de traitements pour les cancers ORL (Ferris, Blumenschein et al. 2016, Qi, Jia et al. 2017, Forster and Devlin 2018).

4. Cancer ORL et TMEM45A

A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur la protéine TMEM45A dans le cancer de la tête et du cou. Les seules données disponibles sont celles référencées dans les bases de données telles que The Human Protein Atlas ou Oncomine. En effet, des courbes de survie ont été établies pour des patients atteints de cancer ORL possédant un faible ou un haut niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A. Dans le cas des cancers tête et cou, les patients présentant un plus haut niveau d'expression de TMEM45A semblent avoir un taux de survie plus important que les patients présentant un faible niveau d'expression de TMEM45A mais aucune corrélation significative n'a été établie (figure I26). De plus, la base de données Oncomine référence le niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A chez les patients atteints des différents types de cancer ORL. Le niveau d'expression de TMEM45A semble être plus important dans les tumeurs hypopharyngées que dans les tumeurs oropharyngées (figure I27). Ces données laissent supposer que la protéine TMEM45A n'aurait pas la même influence suivant la localisation de la tumeur ORL et qu'il serait intéressant d'étudier l'implication de cette protéine dans la réponse aux traitements dans différents types de cancers de la tête et du cou.



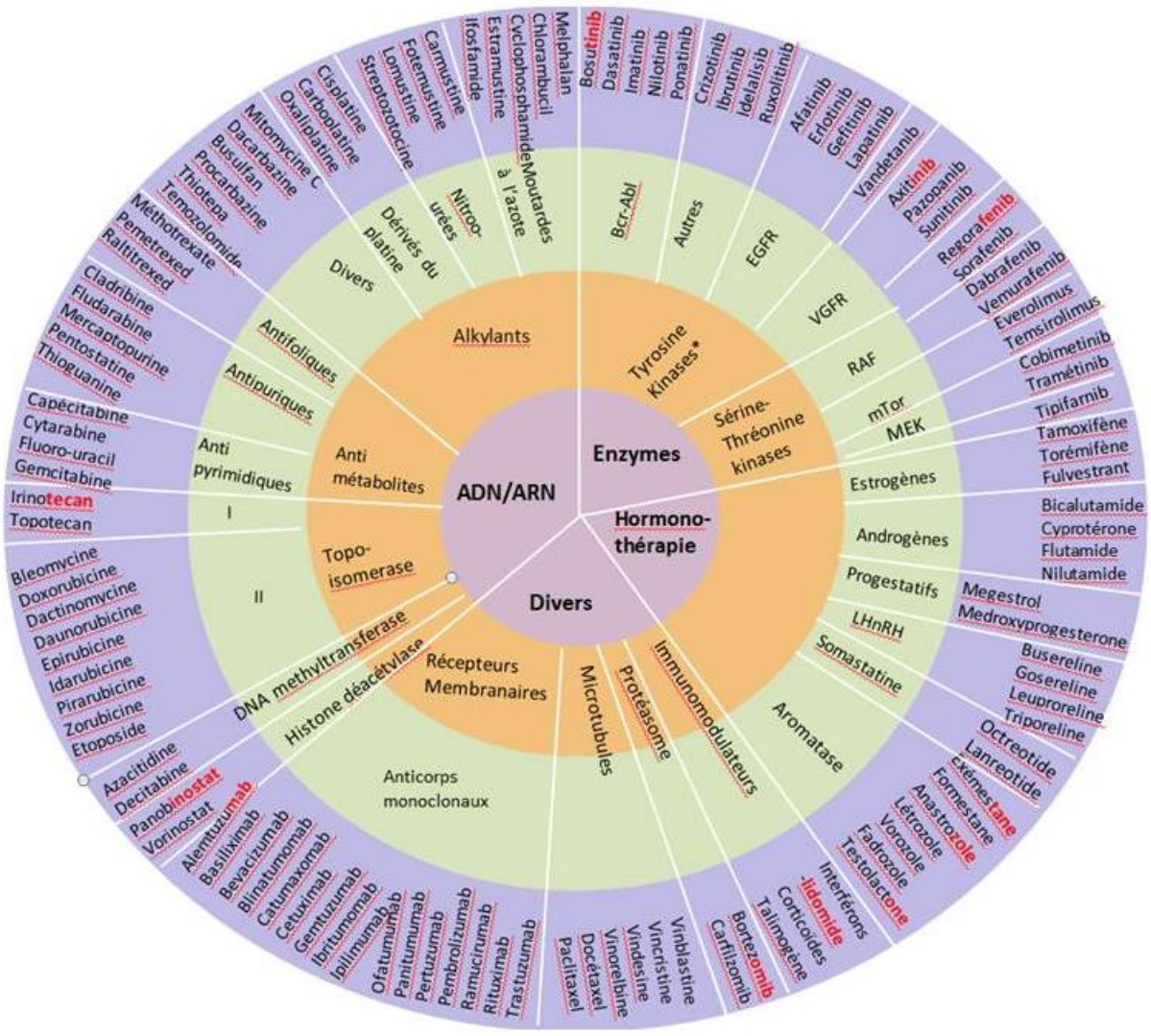
<u>Figure I27</u> : Niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A dans les tumeurs de l'hypopharynx et de l'oropharynx. (Oncomine)

5. *Modèle cellulaire*

De nombreuses lignées cellulaires de cancer ORL ont été établies à des fins de recherche. Des études comparatives entre des échantillons de tumeurs et des lignées cellulaires ont permis de mettre en évidence la présence de mutations uniquement dans les lignées cellulaires et donc acquises lors de la transformation maligne nécessaire à l'établissement de lignées immortelles. Ainsi les lignées cellulaires dont le profil de mutation est proche des échantillons de patients pourraient être utilisées dans le cadre de recherche translationnelle (Li, Wawrose et al. 2014). Cependant, encore beaucoup de lignées sont peu caractérisées et aucune étude comparative de l'utilisation des différentes lignées n'a été réalisée. Comme le niveau d'expression de TMEM45A semble varier entre les différentes tumeurs de la sphère ORL, nous avons décidé de travailler sur deux modèles différents : la lignée Cal27 dérivée d'un carcinome épidermoïde de la base de la langue (oropharyngé), cette lignée est connue pour être radiosensible (Schiefler, Piontek et al. 2014) et la lignée SQD9 dérivée de la lignée SQ20 issue d'un carcinome du larynx radiorésistante (Smeets, Mooren et al. 1994). Ces deux lignées sont mutées pour p53.

Conclusion

Malgré les avancées de la recherche et le développement de nouvelles thérapies, le taux de survie des patients atteints de cancer ORL n'augmente pas et la majorité des patients qui présentent une tumeur de stade avancée rechutent et développent des métastases. De plus, ce type de cancer a un impact sévère sur la qualité de vie du patient. Il est donc primordial d'identifier de nouveaux biomarqueurs qui pourraient aider à une détection plus précoce de la pathologie et de développer de nouvelles thérapies contre le cancer de la tête et du cou. Ainsi l'étude de la protéine TMEM45A dans le développement et la réponse aux traitements des cancers ORL semble pertinente.



<u>Figure I28</u> : Cibles et mécanismes d'action des agents anticancéreux. PHARMACOmédicale.org

Chapitre 6 : Cisplatine et mort cellulaire

Les débuts de la chimiothérapie ont commencé dans les années 1940 par la découverte des propriétés anti-tumorales des moutardes azotées lors d'autopsies de corps de soldats exposés à ces agents durant la Première Guerre mondiale (Chabner and Roberts 2005). Depuis lors, les recherches sur les agents anti-cancéreux se sont multipliées. Ces agents tendent tous à inhiber une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses, leur capacité à proliférer. Ils sont classés en fonction de leurs mécanismes d'action (Paynes and Miles 2008). Il existe diverses classes d'agent anti-cancéreux qui peuvent cibler la molécule d'ADN, les enzymes, les hormones mais également le protéasome (figure I28). Parmi ces composés, il existe des agents anti-mitotiques qui ciblent les microtubules comprenant les vinca-alcaloïdes (vincristine et vinblastine) et les taxanes (paclitaxel), les inhibiteurs de topoïsomérases qui s'interposent entre les isotopoïsomérases et l'ADN provoquant des cassures double brin lors de la réplication (camptothécine), les inhibiteurs de Sérine-Thréonine kinase ou de Tyrosine kinase qui inhibent notamment les voies de signalisation des facteurs de croissance (sunitinib), les anti-métabolites constitués de composés chimiques qui entrent en compétition avec des substrats naturels (5-fluorouracil), les antibiotiques anti-tumoraux (actinomycine D) et les agents alkylants produisant des adduits à l'ADN (cisplatine). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à cette dernière classe d'agents chimiothérapeutiques.

Les agents alkylants sont des composés électrophiles qui forment des groupements alkyles au niveau des atomes d'azote cycliques et des atomes d'oxygène extracycliques des bases de l'ADN. Ces réactions génèrent des adduits à l'ADN pouvant mener à des cassures simple et double brins, un arrêt de la transcription, de la réplication et du cycle cellulaire, et induisant l'apoptose (Drablos, Feyzi et al. 2004). Parmi les plus connus se trouvent les agents alkylants à base de platine tels que le cisplatine.

1. Mode d'action du cisplatine

Le cisplatine fut synthétisé pour la première fois en 1844 par M. Peyronne. Cette molécule n'attire l'attention des scientifiques seulement qu'à partir de 1960 lorsque Rosenberg démontre que le cisplatine est capable d'inhiber la division cellulaire chez *Escherichia coli*. A partir de ce moment, le cisplatine est perçu comme un nouvel agent anti-cancéreux (Rosenberg, Vancamp et al. 1965). Après avoir constaté que le cisplatine avait des propriétés cytotoxiques, il est utilisé comme traitement systémique de divers cancers à la fin des années 70. En 1978, le cisplatine est le premier composé de platine approuvé par la FDA comme traitement contre le cancer (Kelland 2007). Les agents chimiothérapeutiques à base de platine sont utilisés dans de nombreux types de cancer tels que le cancer du poumon, le cancer de la tête et du cou, le cancer colorectal ou le cancer de la vessie (Lebwohl and Canetta 1998).

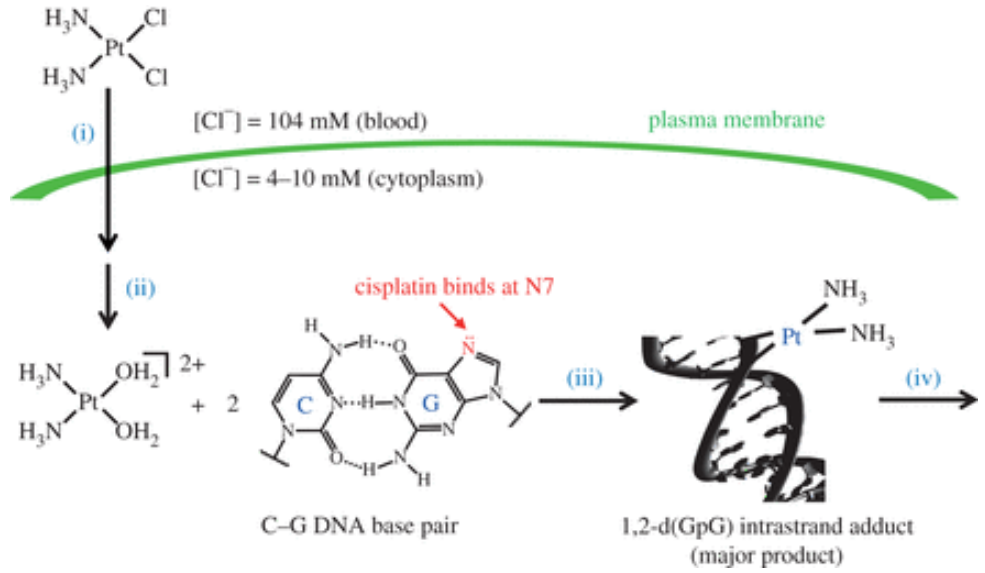


Figure I29 : Schématisation de l'activation du cisplatine. La molécule de cisplatine entre dans le cytoplasme (i) où elle est activée par le remplacement des groupements chlore par des groupements d'eau (ii). Une fois activée, la molécule de cisplatine se lie à l'ADN principalement au niveau de la position N7 des guanines et cytosines (iii) provoquant des adduits à l'ADN (iv). (Johnstone, Suntharalingam et al. 2015)

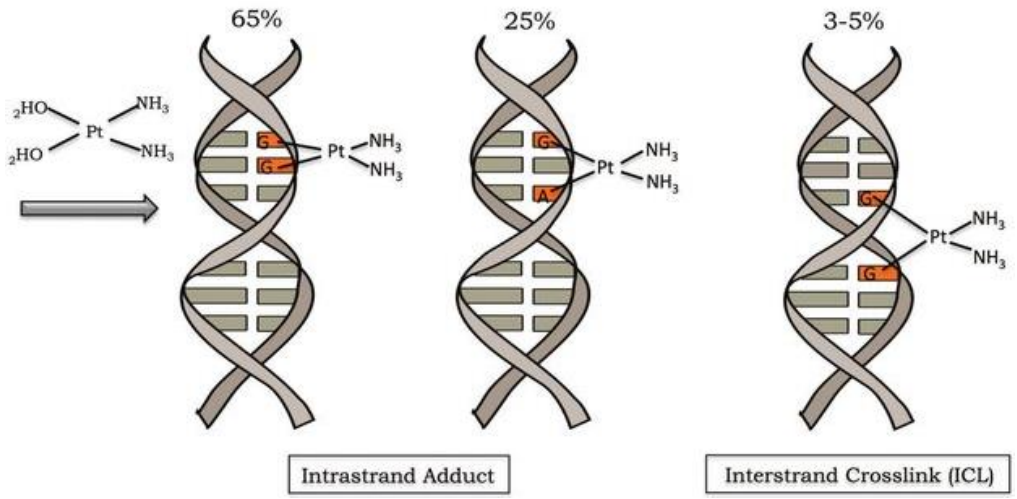


Figure I30 : Représentation des dommages à l'ADN induits par le cisplatine. Une fois la molécule de cisplatine activée, elle peut former deux grandes catégories d'adduits, les adduits au sein d'un même brin, on parle alors d'adduits intrabrin ou bien entre deux brins d'ADN différents, on parle alors de liaison croisée de la double hélice d'ADN. Les principaux adduits formés par le cisplatine sont des adduits intrabrin qui représentent 90% des dommages à l'ADN induits par le cisplatine (1,2-intrastrand ApG and GpG). (Rocha, Silva et al. 2018)

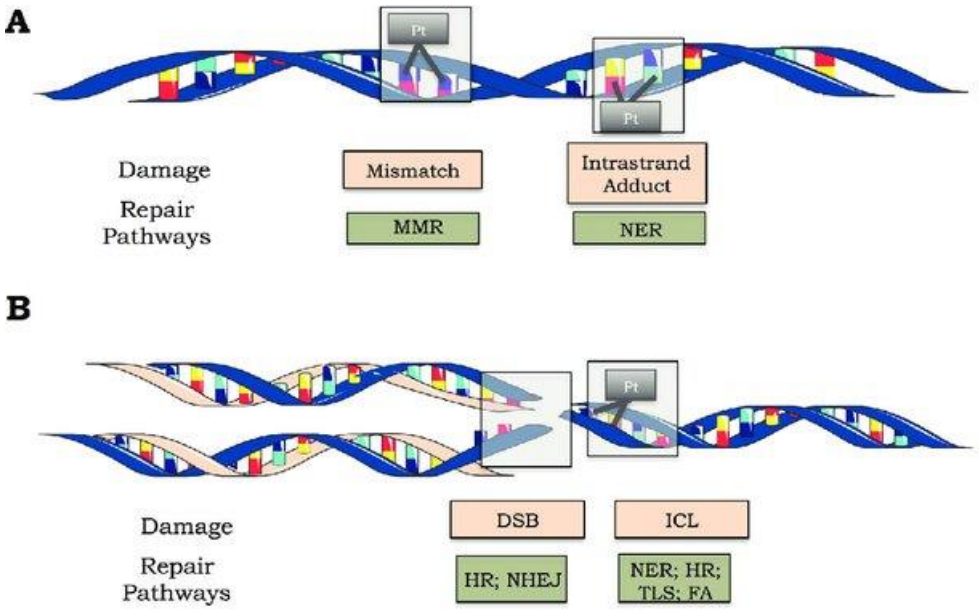
Au niveau cellulaire, la molécule de cisplatine nécessite une étape d'activation lorsqu'elle pénètre dans la cellule. Cette activation passe par une série de réactions aqueuses spontanées qui entrainent le remplacement séquentiel des composés cis-chloro par des molécules d'eau (figure I29) (el-Khateeb, Appleton et al. 1999).

Le produit hydrolysé peut alors réagir avec tout agent nucléophile présent dans la cellule comme les groupes sulfhydriles des protéines ou les atomes N des acides nucléiques. Ainsi le cisplatine induit des dommages à l'ADN qui bloquent la machinerie de réplication et poussent les cellules vers une mort cellulaire. Il a été montré que le cisplatine pouvait également induire la mort cellulaire par induction d'un stress oxydatif, en particulier par la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau des mitochondries et par la diminution du pool d'antioxydants intracellulaire comme la forme réduite du glutathion (GSH), et par induction d'un stress du réticulum endoplasmique.

1.1 Dommages à l'ADN

La cytotoxicité du cisplatine est principalement due à son interaction avec l'ADN. En effet, le cisplatine se fixe à un site nucléophile de l'ADN par liaison covalente formant ainsi des adduits à l'ADN. Deux types d'adduits existent, ceux au sein d'une même molécule d'ADN (lien intra-brin) et ceux entre deux molécules d'ADN (lien inter-brin). En raison de la forte réactivité nucléophile de la position N7 et de la position O6 de la guanine, les agents alkylants induisent plus de dommages au niveau de cette base de l'ADN (Eastman 1987, Fu, Calvo et al. 2012). Il a été décrit dans la littérature que les adduits formés au sein d'un même brin sont majoritairement responsables de l'action cytotoxique du cisplatine. Ces données concordent avec le fait que 85 à 90% des lésions à l'ADN formées sont des adduits entre les bases purines d'un même brin (1,2-intrastrand ApG and GpG) (Kelland 1993) (figure I30).

La majorité des adduits générés par le cisplatine au sein d'un même brin sont réparés par la voie de réparation par excision de nucléotides NER (Nucleotide Excision Repair). On distingue deux types de mécanismes de réparation par excision de nucléotides : le GGR (Global Genome Repair), qui reconnait et répare les dommages sur l'ensemble du génome et le TCR (Transcription-Coupled Repair) qui répare les lésions des gènes activement transcrits. La voie NER passe par l'excision sur le brin endommagé d'un segment de plusieurs nucléotides encadrant la lésion. Cette étape diffère entre les voies GGR et TCR. Dans le cas du GGR, la reconnaissance de la lésion se fait par un hétérodimère XPC-HR23B alors que pour le TCR, cela entraine le blocage de l'ARN polymérase II en association avec les protéines CSA et CSB. Puis des hélicases (XPB et XPD) ouvrent le duplexe d'ADN de part et d'autre afin de permettre la section de la lésion par des endonucléases simple brin (XPF/ERCC1 et XPG). Après excision, une ADN polymérase vient remplacer la séquence excisée en utilisant le brin intact comme



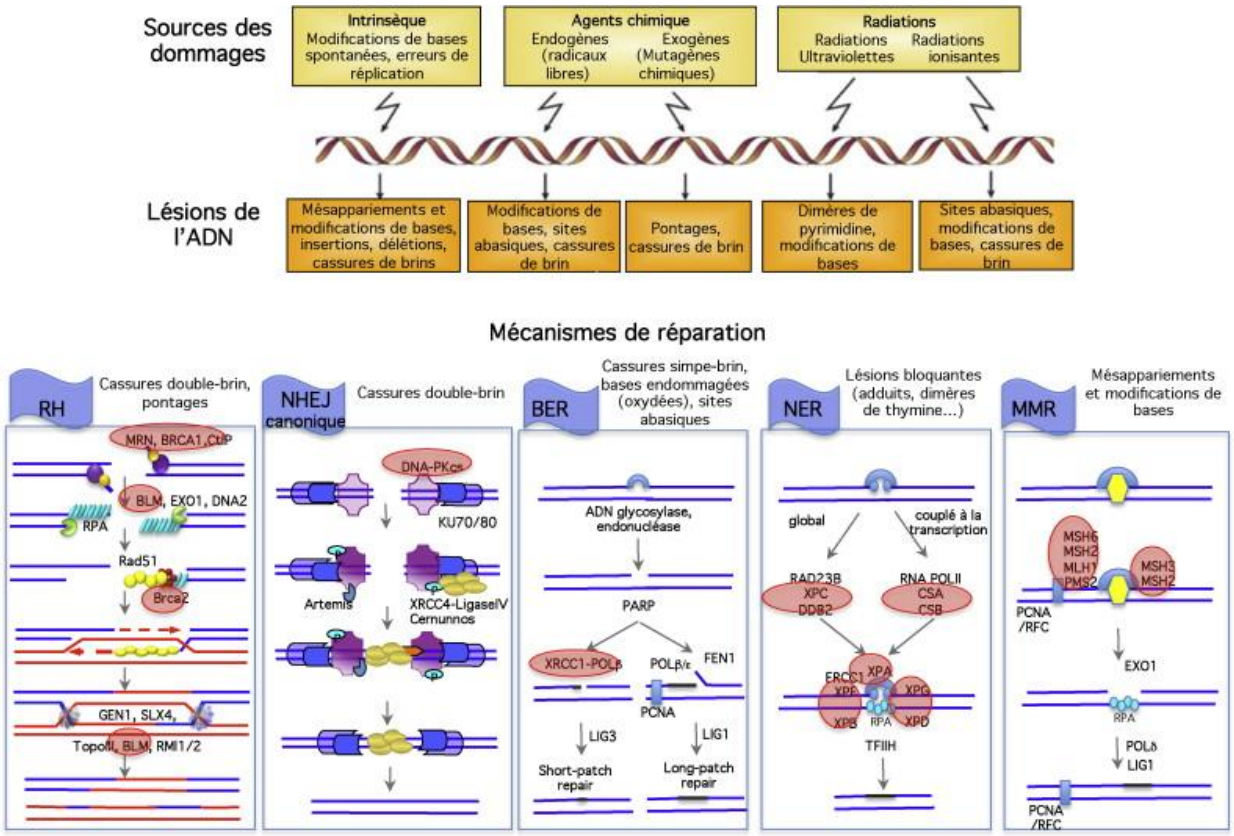
<u>Figure I31</u> : Mécanismes de réparation des dommages à l'ADN induits par le cisplatine. (A) Les dommages à l'ADN au sein d'un même brin d'ADN sont détectés et réparés par le mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER). Ces dommages peuvent également être reconnus par la voie de réparation des mésappariements (MMR) mais ce mécanisme ne permet pas leur réparation. (B) Les dommages à l'ADN provoquant des cassures double brin sont pris en charge par les mécanismes de recombinaison homologue (HR) et la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) alors que les liaisons croisées de la double hélice d'ADN (ICL) sont réparées par les mécanismes NER, HR mais également la synthèse translésionnelle (TLS) et par des protéines impliquées dans l'anémie de Fanconi (FA). (Rocha, Silva et al. 2018)

matrice. La réaction est terminée par l'action d'une ADN ligase qui suture le squelette phosphodiester de l'ADN (Zhang, Rohde et al. 2009) (figures I31 et I32).

Ce genre d'adduits peut également être reconnu par la voie de réparation des mésappariements MMR (Mismatch repair). La voie MMR est responsable de la correction des erreurs simple brin telles que les mismatches ou les insertions/délétions qui ont lieu durant la réplication. De façon similaire à la voie NER, la voie MMR consiste en la reconnaissance et l'excision de la lésion, la resynthèse du brin endommagé et la ligation du brin néosynthétisé. La première étape fait intervenir deux hétérodimères, MutSα (formé de MSH2-MSH6) et MutSβ (formé de MSH2-MSH3) tous deux formant un complexe avec MutL. L'excision du brin endommagé se fait alors par l'exonucléase EXO1 puis la resynthèse est effectuée par deux polymérases : Polδ et Polε. Dans une cellule saine, lorsque le système détecte un mésappariement lors de la réplication, il détecte aussi le brin qui doit être corrigé via le profil de méthylation différent entre le brin préexistant et le brin néosynthétisé. Cependant, suite à une exposition au cisplatine, cette voie de réparation permet seulement la reconnaissance des dommages et non leur réparation. En effet, la voie MMR remplace la base face à l'adduit laissant ainsi la source du mismatch intact. Face à ce phénomène, la cellule va relancer le système MMR. La génération de plusieurs cycles d'excision du brin endommagé peut alors entrainer la formation de cassures double brin (Martin, Lord et al. 2010) (figures I31 et I32).

Outre l'apparition de cassures double brin via la voie MMR, le cisplatine peut également induire des cassures double brin à l'ADN par un autre mécanisme. En effet, lorsqu'un adduit à l'ADN se forme entre deux brins, il génère une cassure double brin lors de la formation de la fourche de réplication. Suite à ces dommages à l'ADN, deux voies de réparation se mettent en place, la recombinaison homologue RH (Homologous Recombination) et la jonction d'extrémités non homologues NHEJ (Non Homologous End Joining) (Hartlerode and Scully 2009, Lieber 2010).

La recombinaison homologue est caractérisée par l'utilisation de la séquence d'ADN homologue au site de lésion comme modèle pour corriger le brin endommagé. Après l'induction de la cassure double brin, le site endommagé est reconnu par des kinases senseurs, telles que ATM, qui entrainent alors un arrêt du cycle cellulaire et le recrutement de protéines impliquées dans la réparation homologue. Ce recrutement passe par la phosphorylation d'une protéine importante : H2AX. Comme la voie RH requiert le brin homologue pour effectuer la réparation, ce système se met en place uniquement dans les cellules en prolifération. Suite à la formation d'une cassure double brin de l'ADN, la recombinaison homologue est initiée par la dégradation, de part et d'autre de la cassure, du brin d'ADN orienté dans le sens 5'-3'. L'ADN simple brin généré par la résection est immédiatement lié par la protéine de réplication A (RPA) qui doit être déplacée pour permettre à la recombinase Rad51 de s'assembler en un filament sur cet ADN simple brin. La recombinase Rad51 utilise l'information de séquence de l'ADN simple brin afin d'identifier la séquence homologue au site de cassure. Une fois la séquence homologue identifiée au sein du filament de RAD51, la protéine RAD54 glisse le long du filament et, en



<u>Figure I32</u> : Acteurs des différentes voies de réparation des dommages à l'ADN. La figure du haut décrit les lésions à l'ADN formées en fonction de la source des dommages générés. La figure du bas reprend les acteurs majeurs des différentes voies de réparation des dommages à l'ADN. (Rass, Grabarz et al. 2012)

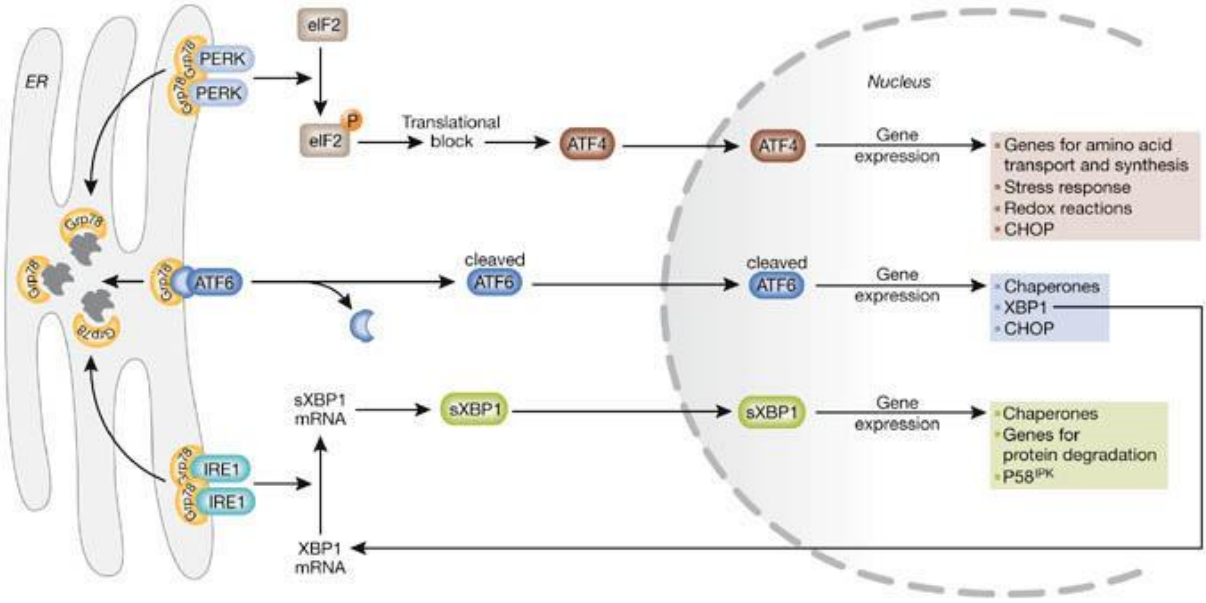
même temps qu'elle enroule le brin d'ADN "chercheur" et son complémentaire pour former un ADN hétéroduplex, elle détache la protéine RAD51. La structure résultant de cet échange de brins, qui comporte un ADN double brin hétéroduplex et un ADN simple brin déplacé, est connue sous le nom de D-loop (pour Displacement loop). L'extrémité 3' de la molécule cassée se retrouve hybridée à son homologue intact au sein de la D-loop. Une ADN polymérase vient alors étendre cette extrémité en utilisant l'ADN complémentaire intact comme matrice (Hartlerode and Scully 2009, Lieber 2010) (figures I31 et I32).

Dans le cas de la voie NHEJ, les cassures double brin sont reconnues par un hétérodimère constitué de Ku70/Ku80. Puis, DNA-PKcs se lie à l'ADN, permettant au complexe Artemis-DNA-PKCs de fonctionner comme une endonucléase et de cliver quelques nucléotides au site de cassure. La synthèse du nouveau brin est alors effectuée par les ADN polymérases μ and λ, et l'ADN ligase IV peut suturer le squelette phosphodiester de l'ADN. Les cassures double brin générées en phase G0/G1 sont principalement réparées par la voie NHEJ. Contrairement à la voie RH, la voie NHEJ est considérée comme un mécanisme de réparation des dommages à l'ADN inducteur d'erreurs puisqu'il peut générer des délétions de quelques nucléotides lors de l'étape de ligation (Hartlerode and Scully 2009, Lieber 2010) (figures I31 et I32).

Lorsqu'un dommage à l'ADN est reconnu, la cellule met en place, suivant la nature du dommage, divers processus permettant la réparation de la lésion et ainsi la survie cellulaire. Si la cellule ne parvient pas à réparer les dommages à l'ADN, celle-ci active des voies de signalisation dont celles incluant ATR, p53, p73 ou encore les MAPKs, pour initier la mort cellulaire programmée ou apoptose. Les différentes voies de mort cellulaire programmées sont présentées plus loin dans ce chapitre (Siddik 2003).

1.2 Angiogenèse

Le cisplatine peut impacter la croissance tumorale par des voies indépendantes des dommages à l'ADN. En effet, le cisplatine possède un effet anti-angiogénique qui est resté méconnu pendant de nombreuses années. Des études ont mis en évidence une action anti-angiogénique du cisplatine dans divers types de cancer tels que le cancer ovarien (Li, Wan et al. 2014) et le cancer des poumons (Lee and Wu 2015). Dans ce dernier modèle, l'effet anti-angiogénique du cisplatine a été associé à la sécrétion de la protéine TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Matrix metalloproteinases-1), facteur anti-angiogénique, par les cellules cancéreuses (Ramer, Schmied et al. 2018). De plus, il a été montré qu'un traitement à faible dose avec du cisplatine réduisait la densité de la néovascularisation dans un modèle murin de xénogreffe de cancer de la tête et du cou (Adhim, Lin et al. 2012).



<u>Figure I33</u> : Voie de signalisation en réponse à un stress du réticulum endoplasmique (RE) : Unfolded Protein Response. Suite à une accumulation de protéines mal repliées, la protéine GRP78 se dissocie des trois senseurs de stress : PERK (PKR-like RE kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6 et IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1) permettant leur activation. L'activation de ces senseurs se fait de façon graduelle, avec une activation de PERK dans un premier temps suivi de ATF6 et enfin d'IRE1. PERK inhibe la traduction des protéines en phosphorylant la protéine eIF2α (eukaryotic Initiation Factor 2α). Cependant la protéine ATF4 (Activating Transcription Factor 4), facteur de transcription, est traduite par un mécanisme indépendant de eIF2α permettant l'induction de l'expression de gènes requis pour la restauration de l'homéostasie du RE. Une fois activé et clivé, ATF6 agit également comme facteur de transcription induisant l'expression de chaperonnes et du gène XBP1 (X Box-binding Protein 1). L'ARNm de XBP1 est alors épissé par IRE1. Il est ensuite traduit en un facteur de transcription qui sera ensuite transloqué au noyau. (Szegezdi, Logue et al. 2006)

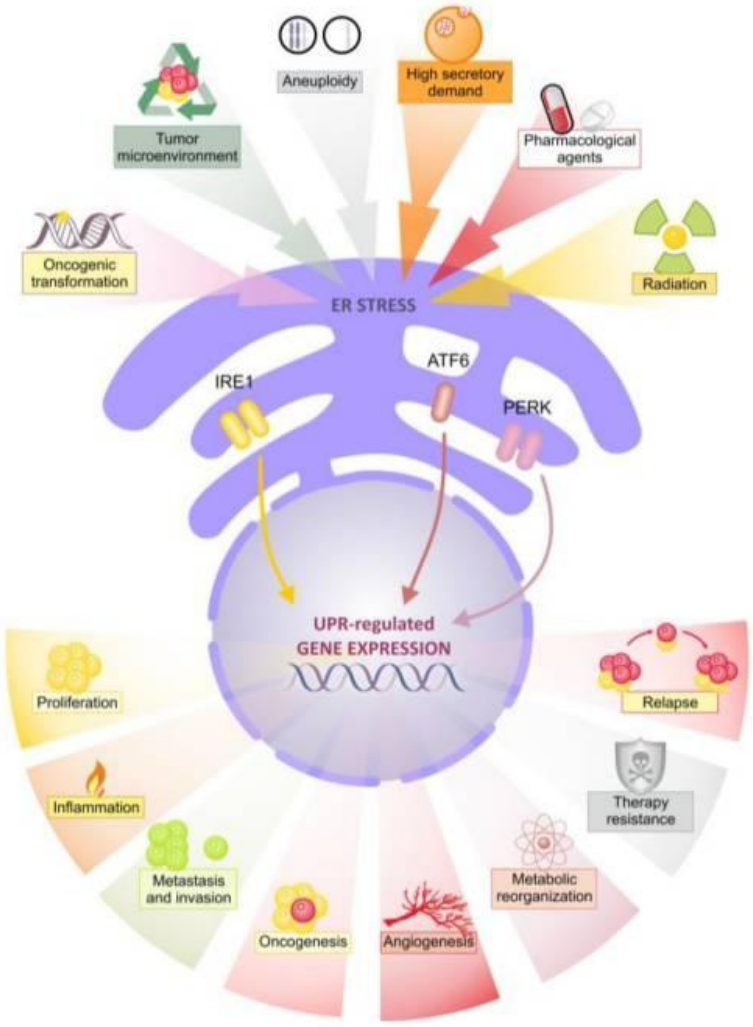
De récentes études se sont intéressées au développement d'une nouvelle molécule à base de platine très proche du cisplatine, [Pt (O, O′-acac) (γ-acac) (DMS)]. Cette nouvelle drogue, décrite par De Pascali et al en 2009, a été conçue de façon à ne pas cibler le génome (De Pascali, Papadia et al. 2009). Muscella et al en 2014 ont montré que ce nouvel agent anti-cancéreux avait un rôle anti-métastatique *in vitro* dans un modèle de cancer du sein humain via une diminution de la synthèse des métalloprotéases et de la migration des cellules cancéreuses (Muscella, Vetrugno et al. 2014, Muscella, Vetrugno et al. 2014, Staff 2015) . Cette drogue possède également un effet anti-angiogénique via une diminution de la migration des cellules endothéliales et du niveau d'expression du VEGF. De plus, ce nouveau composé présente une plus grande cytotoxicité *in vitro* accompagnée d'une réduction de la toxicité normalement observée sur le rein et le foie par le cisplatine, faisant du [Pt (DMS)] un nouveau candidat pour le développement de nouveaux traitements (Vetrugno, Muscella et al. 2014).

1.3 Unfolded Protein Response

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite qui joue un rôle essentiel dans le repliement et la maturation des protéines sécrétées et membranaires, dans la biosynthèse des lipides et l'homéostasie du calcium (Ca2+). De nombreuses conditions environnementales physiologiques ou pathologiques peuvent perturber le repliement des protéines du RE. Une accumulation de protéines mal repliées ou mal conformées conduit à un stress du réticulum endoplasmique. Face à ce stress, la cellule met en place une réponse adaptative permettant de restaurer l'homéostasie du RE : l'UPR (Unfolded Protein Response). L'activation de l'UPR entraine une diminution de la traduction, une augmentation de la capacité du RE à prendre en charge les protéines mal repliées, mais également une augmentation de la dégradation des protéines mal conformées par autophagie ou par le système de dégradation associé au RE : ERAD (ER-Associated Degradation). Cependant, si la mise en place de ces mécanismes ne suffit pas à restaurer l'homéostasie, la cellule entre en mort cellulaire.

La voie de signalisation UPR est médiée par trois protéines localisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique : IRE1α (Inositol Requiring Enzyme 1), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et PERK (PKR-like ER Kinase). En absence de stress, ces trois senseurs sont liés à une protéine chaperonne, GRP78 (Glucose Regulated Protein 78 kDa) qui les maintient inactifs. Suite à un stress du réticulum endoplasmique, GRP78 se décroche entrainant l'activation des trois médiateurs de la voie UPR (Rutkowski and Hegde 2010, McGrath, Logue et al. 2018) (figure I33).

En réponse au stress du RE, IRE1α peut soit promouvoir la survie, soit la mort cellulaire. IRE1α interagit avec GRP78 et les protéines mal repliées au niveau de sa région N-terminale située dans le compartiment luminal du RE. En condition de stress, IRE1α forme des homodimères



<u>Figure I34</u> : Stress associés aux tumeurs capables d'induire l'activation de l'UPR. Lors de la croissance tumorale, les cellules cancéreuses sont confrontées à de nombreux stress qui induisent un stress au réticulum endoplasmique, conduisant à l'activation de la voie UPR. La nature de ces stress est très diverse allant de l'activation d'oncogènes à l'hypoxie ou à l'exposition à des agents chimiothérapeutiques. (McGrath, Logue et al. 2018)

menant à une juxtaposition de ses domaines kinases au niveau de la région C-terminale. Puis, la protéine subit des trans-autophosphorylations séquentielles provoquant un changement de conformation et l'activation de son domaine RNase également situé dans la région C-terminale. L'activité kinase de la protéine peut mener à la mort cellulaire via la voie JNK (c-jun n-terminal kinase) et l'activation de protéines pro-apoptotiques telles que BID et BAD (Tabas and Ron 2011). Le domaine RNase de IRE1α a, quant à lui, deux fonctions : l'épissage de l'ARNm XBP1 (X-box Binding Protein 1) et la dégradation d'ARNm spécifiques, on parle alors d'activité RIDD (Regulated IRE1 Dependent RNA Decay). IRE1α est responsable de l'épissage de 26 nucléotides de l'ARNm de XBP1, qui code alors pour un facteur de transcription. XBP1 intervient dans l'adaptation du stress du RE en augmentant l'abondance de chaperonnes et en activant la machinerie de dégradation ERAD (McGrath, Logue et al. 2018). Comme une augmentation d'expression aux niveaux ARNm et protéique n'est pas forcément signe d'une activation de la protéine, l'abondance de la forme épissée de XBP1 est couramment utilisée pour refléter le niveau d'activation de IRE1α.

De façon similaire à IRE1α, PERK possède un double rôle dans le devenir de la cellule face au stress du RE et peut soit mener à la survie, soit à la mort de la cellule. PERK possède un domaine kinase qui est activé par trans-autophosphorylation. Une fois activé, PERK phosphoryle la protéine eIF2α (Eukaryotic Initiation Factor 2α) bloquant la traduction dépendante de la coiffe de la majorité des ARNm. L'arrêt de la traduction permet alors au RE de prendre en charge les protéines mal conformées présentes au sein de la cellule. Cependant, certains ARNm tels que ATF4 (Activating Transcription Factor 4) peuvent être traduits par des mécanismes indépendants de la coiffe (Pakos-Zebrucka, Koryga et al. 2016). ATF4 est un facteur de transcription dont les gènes cibles encodent des protéines nécessaires à l'autophagie ou encore à l'activation de la mort cellulaire (Szegezdi, Logue et al. 2006).

Le dernier médiateur, ATF6, est principalement impliqué dans la survie cellulaire. En condition de stress, ATF6 est transloqué du réticulum endoplasmique vers le Golgi où il est clivé par deux protéases : site-1 et site-2. La forme clivée d'ATF6 (ATF6c) est alors transloquée au noyau afin d'exercer son rôle de facteur de transcription. ATF6c entraine l'expression de gènes tels que *XBP1*, *GRP78* et des chaperonnes nécessaire au maintien de l'homéostasie du RE (Haze, Yoshida et al. 1999, Rutkowski and Hegde 2010).

Le stress du RE et l'activation de l'UPR ont tous deux étaient recensés comme étant impliqués dans de nombreux types de cancers et leur développement dont le cancer de la prostate (Sheng, Arnoldussen et al. 2015), du sein (Scriven, Coulson et al. 2009) et du colon (Li, Zhang et al. 2017). L'activation de l'UPR dans les cellules malignes est attribuée à la fois à des facteurs intrinsèques tels que l'hyperactivation d'oncogènes qui peut mener à une augmentation de la synthèse protéique ou à des facteurs extrinsèques provenant du microenvironnement tumoral tels que l'hypoxie (figure I34) (Wang and Kaufman 2014, McGrath, Logue et al. 2018).

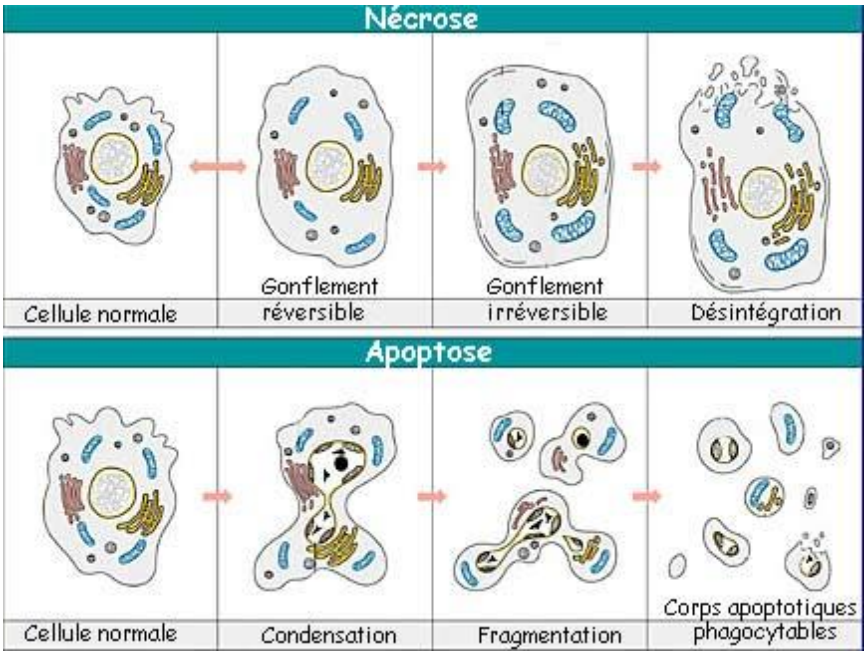
Outre les dommages à l'ADN, le cisplatine est capable d'induire la mort cellulaire via un stress du réticulum endoplasmique (Mandic, Hansson et al. 2003). Une seconde étude réalisée en 2007 a révélé que le cisplatine induisait l'apoptose dans des cellules de rein énucléées chez la souris (Yu, Megyesi et al. 2007). Deux études ont démontré qu'une exposition au cisplatine induisait un stress du réticulum endoplasmique, une augmentation de l'abondance de GRP78, de PDI et de CHOP ainsi qu'une activation de la caspase 4 dans divers types de lignées cellulaires cancéreuses (Yu, Su et al. 2011, Xu, Yu et al. 2012). Ces résultats indiquent que le cisplatine induit également l'apoptose via un stress du réticulum endoplasmique. Notte et al ont également montré que dans le cas d'une exposition au taxol, la voie UPR était activée dans des cellules de cancer du sein (Notte, Rebucci et al. 2015).

Cependant, le rôle de l'UPR dans la régulation de la mort cellulaire induite par le cisplatine est très fortement controversé. Des études ont révélé qu'une activation de la voie UPR contribuerait à une résistance des cellules cancéreuses face à la mort induite par des agents chimiothérapeutiques (Xu, Wang et al. 2014, Notte, Rebucci et al. 2015). En fait, il semblerait qu'une activation modérée de la voie UPR possède un rôle anti-apoptotique menant à une survie cellulaire et à une résistance aux agents anti-cancéreux, alors qu'une activation sévère de l'UPR mène à une mort cellulaire par apoptose via l'activation de IRE1α et de PERK (Szegezdi, Logue et al. 2006, Notte, Leclere et al. 2011, Bravo, Parra et al. 2013).

1.4 Impact sur les cellules saines

Les traitements à base de cisplatine peuvent également affecter les cellules saines avoisinant les cellules cancéreuses. C'est le cas par exemple pour le cancer ovarien (Mikula-Pietrasik, Witucka et al. 2018). Lorsqu'une cellule saine est exposée au cisplatine, son métabolisme et en particulier la production d'énergie devient anormale. Des études ont montré qu'une exposition des fibroblastes normaux à des agents chimiothérapeutiques (cisplatine, carboplatine, paclitaxel…) conduisait à une plus grande consommation de glucose et donc à une augmentation de la génération de lactate, acidifiant l'environnement extracellulaire. L'exposition au cisplatine peut également avoir un impact sur le microenvironnement tumoral. En effet, la présence de cet agent anti-cancéreux est capable d'induire la transformation métabolique et phénotypique de fibroblastes normaux en fibroblastes associés au cancer (Peiris-Pages, Sotgia et al. 2015). Les CAFs stimulent l'adhérence et l'invasion des cellules cancéreuses *in vitro* mais également la croissance tumorale et la dissémination métastatique *in vivo* (Cai, Tang et al. 2012). Dès lors, la présence et l'activité des CAFs peuvent jouer un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses face au cisplatine.

L'inflammation est l'une des plus grandes caractéristiques des cancers. Cette inflammation est souvent intensifiée suite à un traitement chimiothérapeutique, ainsi ce phénomène peut



<u>Figure I35</u> : Représentation schématique des mécanismes de mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. La mort cellulaire par nécrose est caractérisée par un gonflement du cytoplasme des cellules menant à une désintégration de la cellule et au déversement du contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire et ainsi à une réaction inflammatoire. La mort cellulaire par apoptose, dite programmée, est caractérisée par la formation de corps apoptotiques suite à la condensation et la fragmentation de la cellule. Ce mécanisme de mort cellulaire n'entraine pas de réaction inflammatoire et permet de conserver l'intégrité du tissu avoisinant. <u>(http://lecerveau.mcgill.ca)</u>

également intervenir dans l'échec de certains traitements et le développement de résistances (Vyas, Laput et al. 2014). C'est le cas du cisplatine, connu pour activer le facteur de transcription NF-κB (Nuclear transcription factor-kappaB) dans des cellules de cancer ovarien (Ohta, Ohmichi et al. 2006). Ce facteur contrôle la production d'agents pro-inflammatoires tels que TNFα (tumor necrosis factor α) et les interleukines IL-1, IL-6 et IL-8 (Hoesel and Schmid 2013). De plus, cette inflammation causée par le cisplatine a été associée à une néphrotoxicité.

2. *Mort cellulaire par apoptose*

La mort cellulaire joue un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques. Elle permet d'éliminer les cellules endommagées, âgées ou en excès sans altérer l'intégrité du tissu environnant. Lorsqu'une cellule se retrouve face à un stress, elle active des voies de signalisation qui peuvent soit permettre sa survie, soit entrainer sa mort (Elliott and Ravichandran 2010, Fulda, Gorman et al. 2010). Le destin de la cellule dépend alors de la nature et du temps d'exposition au stress, mais également du type cellulaire.

Il existe deux types majeurs de morts cellulaires : la nécrose et l'apoptose. La nécrose est une mort cellulaire dite « accidentelle » qui survient lors d'un dommage tissulaire. Lors de la nécrose, la cellule gonfle puis la membrane cellulaire éclate déversant le contenu cellulaire dans le tissu environnant et provoquant localement une inflammation (Rock and Kono 2008) (figure I35). L'apoptose est, quant à elle, une mort physiologique « programmée » qui a un rôle essentiel notamment au cours du développement embryonnaire et fœtal, dans l'organisation du système nerveux central, ainsi que dans l'élaboration du système immunitaire (Gewies, 2003) (Elliott and Ravichandran 2010). Contrairement à la nécrose, l'apoptose n'entraine pas le relargage du contenu intracellulaire dans le tissu environnant et donc aucune réaction inflammatoire n'est observée lors de ce processus (Huynh, Fadok et al. 2002, Rock and Kono 2008). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes uniquement intéressés à l'apoptose.

Le terme « apoptose » est introduit pour la première fois en 1972 par Kerr et al, et désigne un processus morphologique menant à une autodestruction cellulaire contrôlée (Kerr, Wyllie et al. 1972). Comme mentionné dans le premier chapitre de l'introduction, une déficience dans l'apoptose favorise le développement tumoral et constitue un des hallmarks du cancer (Hanahan and Weinberg 2011).

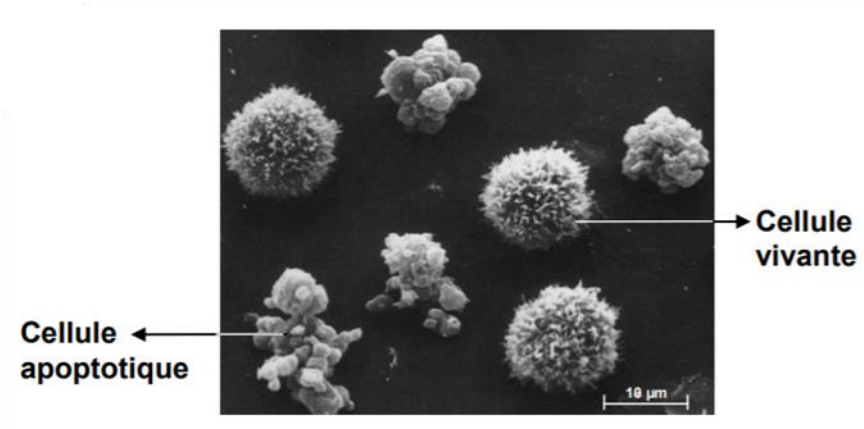


Figure I36 : Photographie par microscopie électronique à balayage de cellules de sarcome de souris. La photographie représente des cellules de sarcomes de souris vivantes couvertes de microvillosités et des cellules en apoptose présentant des corps apoptotiques. (Webb, Harrison et al. 1997)

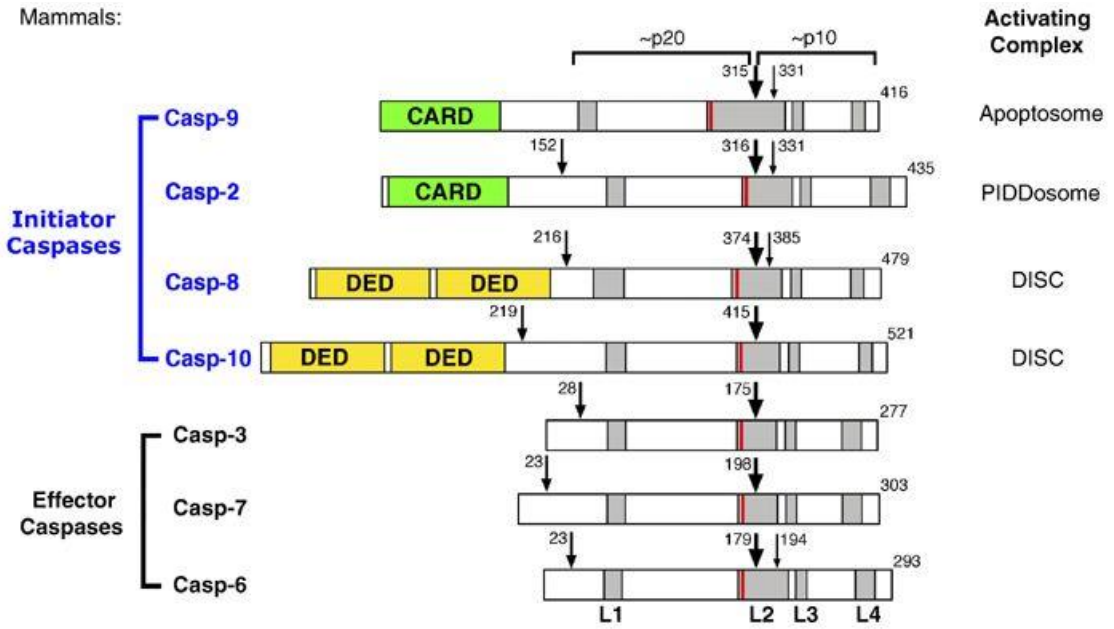


Figure I37 : Organisation structurelle des caspases impliquées dans l'apoptose. Il existe deux classes de caspases, les caspases initiatrices et les caspases effectrices. L'ensemble de ces protéines possèdent une organisation structurelle proche avec un pro-domaine à l'extrémité N-terminale de longueur variable et un domaine catalytique à l'extrémité C-terminale. Ce domaine catalytique est composé de deux sous unités séparées par un peptide linker : P20 qui deviendra après clivage la grande sous-unité et P10 qui constituera la petite sous-unité. Dans le cas des caspases initiatrices, on peut noter la présence soit d'un domaine CARD (Caspase-Recruitment Domain) soit d'un domaine DED (Death Effector Domain) impliqués dans leur processus d'activation. (Bao and Shi 2007)

2.1 Morphologie

Lorsqu'une cellule entre en apoptose, des changements morphologiques caractéristiques surviennent. La cellule se rétracte, la chromatine se condense puis une fragmentation caractéristique de l'ADN survient. La cellule se détache alors progressivement du tissu avoisinant devenant « ronde » et des invaginations apparaissent au niveau de leur membrane. L'évolution des invaginations membranaires aboutit à la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques, vésicules membranaires contenant le cytoplasme et les organites dégradés (figures I36 et I37) (Elmore 2007).

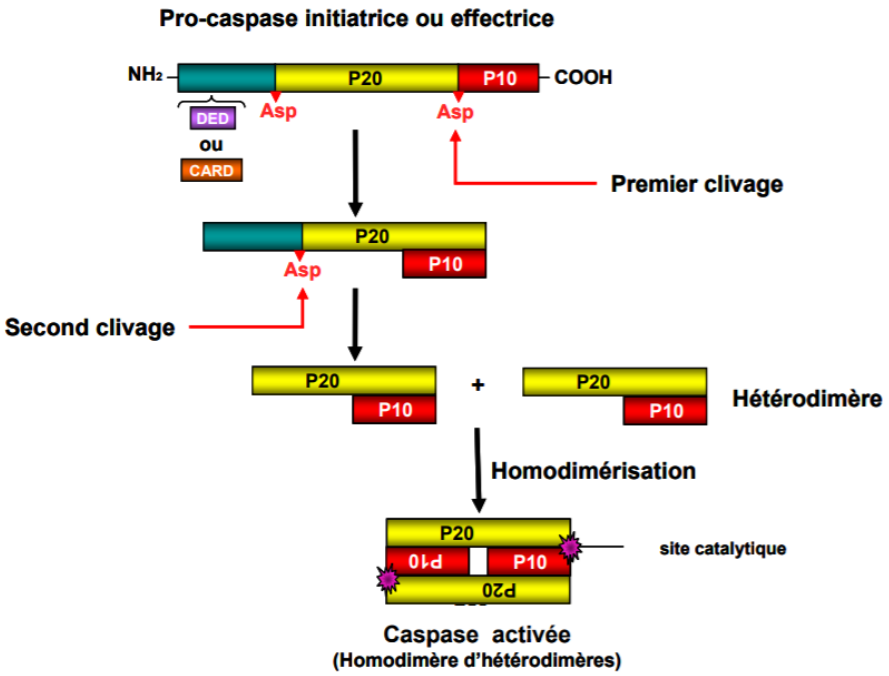
Parmi les organites, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique sont dégradés afin de pouvoir être encapsulés dans ces corps apoptotiques. La membrane mitochondriale externe est également perméabilisée lors de l'apoptose, permettant la libération de protéines signalétiques (Kerr, Wyllie et al. 1972, Majno and Joris 1995, Elmore 2007).

2.2 Les acteurs de l'apoptose

2.2.1 Les caspases

C'est seulement dans les années 1990 que l'apoptose fut associée à l'activation des caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases). Ces protéases comme leur nom l'indique, présentent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique. Les caspases sont les effecteurs principaux de l'apoptose, ces dernières entrainent la mort cellulaire via le clivage de substrats essentiels. Etant donné le rôle crucial des caspases dans le destin de la cellule, leur abondance et leur activation sont hautement régulées. Outre leur rôle central dans l'apoptose, ces enzymes interviennent dans des processus non-apoptotiques tels que la maturation de protéines pro-inflammatoires, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules (Parrish, Freel et al. 2013).

Les caspases sont synthétisées sous forme inactive ou zymogène, appelée pro-caspase. Suite à un signal pro-apototique, ces dernières sont converties en caspases actives. Il existe deux classes de caspases, les caspases initiatrices : Casp-9, Casp-2, Casp-8 et Casp-10 et les caspases effectrices : Casp-3, Casp-7 et Casp-6. L'ensemble de ces protéines partage une organisation structurelle conservée avec un pro-domaine à l'extrémité N-terminale de longueur variable allant de 23 à 219 acides aminés et un domaine catalytique à l'extrémité C-terminale. Ce domaine catalytique est composé de deux sous-unités séparées par un peptide linker : un domaine de 17 à 21 kDa (P20) qui deviendra après clivage la grande sous-unité et un domaine de 10 à 14 kDa (P10) qui constituera la petite sous-unité (Figure I37). L'activation des caspases passe par un rassemblement de ces deux sous-unités, permettant la formation du site actif de la protéine. Pour cela, le peptide linker doit être clivé. L'association des deux sous-unités est suivie de la formation de dimères afin de permettre l'activation des caspases. Ces dimères



<u>Figure I38</u> : Mécanisme d'activation des caspases. Les pro-domaines N-terminaux sont représentés en bleu, les grandes sous-unités sont en jaune et les petites sous-unités en rouge. La caspase active résulte de la protéolyse et de l'assemblage de deux précurseurs. (Amarante-Mendes and Green 1999)

contiennent alors deux copies de chaque sous-unité qui vont prendre une configuration GPPG (G=grande et P=petite) (Pop and Salvesen 2009, MacKenzie and Clark 2012). Les différentes caspases initiatrices se différencient au niveau de leur pro-domaine. En effet, les caspases 2 et 9 possèdent dans leur pro-domaine un domaine CARD (Caspase-Recruitment Domain) tandis que les caspases 8 et 10 possèdent un domaine DED (Death Effector Domain) (Figure I37) (Bao and Shi 2007). Ces différents domaines (DED et CARD) sont impliqués dans le processus d'activation des caspases par des interactions protéine-protéine.

Les caspases sont activées suite à un signal pro-apototique. Cependant, d'autres mécanismes de régulation existent. Par exemple, la caspase 9 possède des nombreux sites de phosphorylation. Cette phosphorylation peut soit provoquer une diminution de son activité et/ou de son clivage, c'est le cas de la phosphorylation réalisée par la CDK1 lors du cycle cellulaire (cyclin-dependent kinase 1) (Allan and Clarke 2007), soit augmenter son activité, c'est le cas de la phosphorylation réalisée par c-Abl en cas de dommages à l'ADN (Raina, Pandey et al. 2005). Un autre exemple de modification post-traductionnelle est la polyubiquitinylation des caspases 9 et 3 actives par XIAP menant à leur dégradation par le protéasome (Suzuki, Nakabayashi et al. 2001, Morizane, Honda et al. 2005).

2.2.2 Activation des caspases initiatrices

D'un point de vue général, l'activation des caspases passe par le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de deux sites consensus contenant un résidu acide aspartique. Chaque caspase activée résulte du clivage protéolytique et de l'auto-association de 2 pro-caspases (figure I38). Les pro-caspases initiatrices sont présentes sous formes de monomères inactifs. Leur activation nécessite leur dimérisation, étape essentielle pour que l'apoptose ait lieu. Une fois les caspases initiatrices activées, elles clivent le peptide linker des pro-caspases effectrices. Ces dernières sont présentes en conditions physiologiques sous forme de dimères stables mais inactifs. Suite au clivage protéolytique de leur peptide linker, un réarrangement de leur site actif permet leur activation.

La pro-caspase 8 (Kischkel, Hellbardt et al. 1995) et la pro-caspase 10 (Kischkel, Lawrence et al. 2001) s'oligomérisent par l'intervention de la protéine adaptatrice FADD (Fas protein with DD) au niveau de leur domaine DED. FADD, par son domaine DD (Death Domain), peut s'associer au récepteur Fas (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). Le complexe, ainsi constitué du récepteur, de FADD et de la pro-caspase, est nommé DISC (Death Inducing Signaling Complex). Le domaine DED de ces deux caspases permet le recrutement et l'activation de ces protéines au niveau d'un récepteur de mort situé à la surface de la cellule suite à son activation. Le complex DISC permet alors de faire le lien entre les caspases et les récepteurs de mort pour induire la voie extrinsèque de l'apoptose.

Contrairement aux autres caspases initiatrices, la pro-caspase 2 est capable de former des dimères et de s'auto-activer lorsque son niveau d'expression est important. Cependant, elle a besoin comme les autres caspases initiatrices de s'associer à des protéines adaptatrices dont la protéine RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with DD) et la protéine induite par p53, PIDD (Duan and Dixit 1997). Le complexe ainsi formé est appelé PIDDosome.

Le mécanisme d'activation de la pro-caspase 9 est comparable à celui des pro-caspases initiatrices 2, 8 et 10. Son activation dépend de la formation d'un complexe multiprotéique, l'apoptosome (Acehan, Jiang et al. 2002). L'apoptosome est constitué du cytochrome c libéré par la mitochondrie, d'Apaf1 (apoptotic protease-activating factor-1), d'ATP et de la pro-caspase 9 (Zou, Li et al. 1999). Dans ce complexe, Apaf-1 joue le rôle de protéine adaptatrice. Il possède en effet une région de liaison CARD, impliquée directement dans le recrutement de la pro-caspase 9 (Acehan, Jiang et al. 2002). Dans un contexte apoptotique, le cytochrome c et l'ATP lient Apaf-1, induisant un changement conformationnel permettant de démasquer alors sa région CARD : la pro-caspase 9 est ainsi recrutée et activée, induisant la voie intrinsèque de l'apoptose. Liu et al ont mis en évidence en 2002 qu'une altération de la formation de l'apoptosome conduisait à une diminution de l'activation de la caspase 9 et de ses cibles dont la caspase 3 menant *in fine* à une résistance au cisplatine dans des lignées de cancer ovarien (Liu, Opipari et al. 2002).

2.2.3 Activation des caspases effectrices

Les caspases 3, 6 et 7, caspases effectrices, ne peuvent être activées par un mécanisme d'auto-activation. En effet, ces protéases disposent d'un domaine court incapable d'initier leur oligomérisation et leur activation. Ainsi leur clivage protéolytique est pris en charge par les caspases initiatrices. L'activation protéolytique des caspases 3 et 7 par l'action directe des caspases 8 et 10 a été mise en évidence (Nagata 1997, Stennicke, Jurgensmeier et al. 1998). De même, la caspase 9 est capable d'induire l'activation des pro-caspases 3 et 7 (Srinivasula, Ahmad et al. 1998). Alors que le clivage des pro-caspases 3 et 7 peut résulter de l'action directe des caspases 8, 9, 10. De plus, des expériences *in vitro* montrent que la pro-caspase 6 est clivée uniquement par les caspases 3 et 7 (Srinivasula, Ahmad et al. 1998, Slee, Harte et al. 1999). Il a été montré que le cisplatine induisait l'apoptose via une activation de la caspase 3 (Mandic, Hansson et al. 2003).

2.2.4 Substrats clivés par les caspases effectrices

Suite à leur activation, les caspases effectrices déclenchent, via le clivage de nombreux substrats, la phase d'exécution de l'apoptose. Parmi ces substrats, on retrouve des protéines

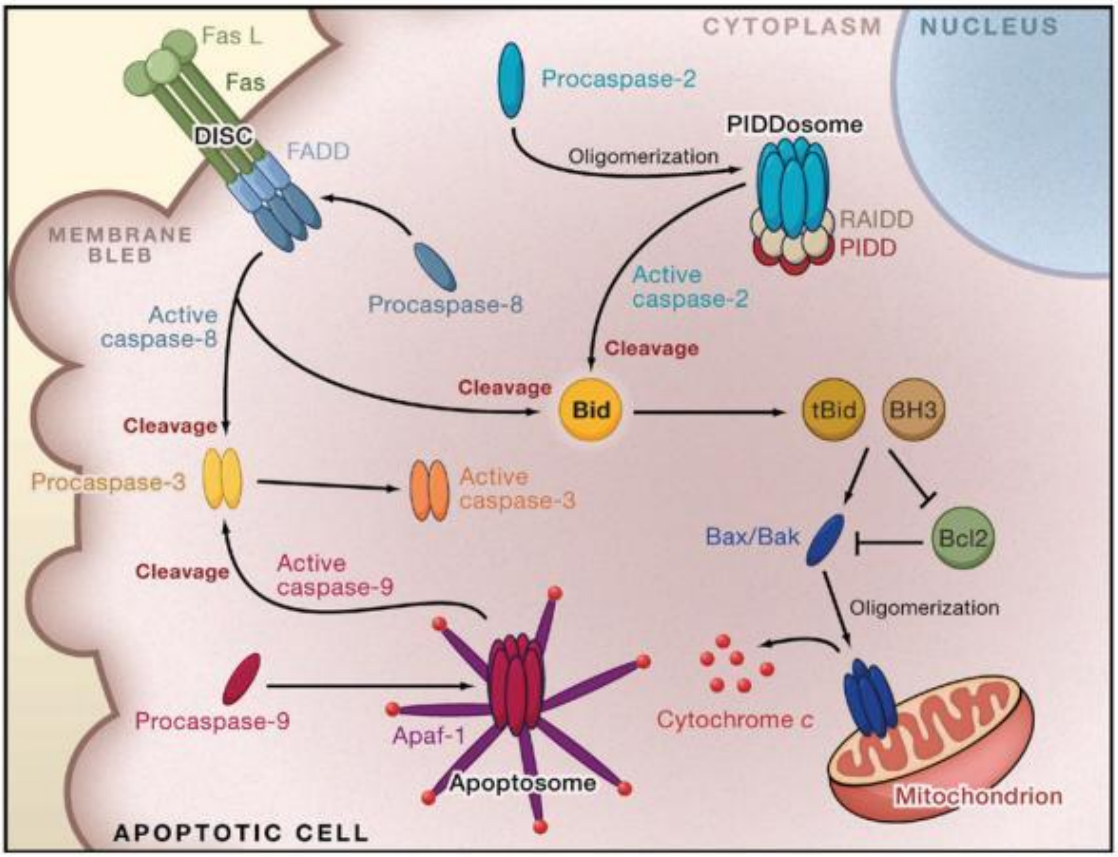


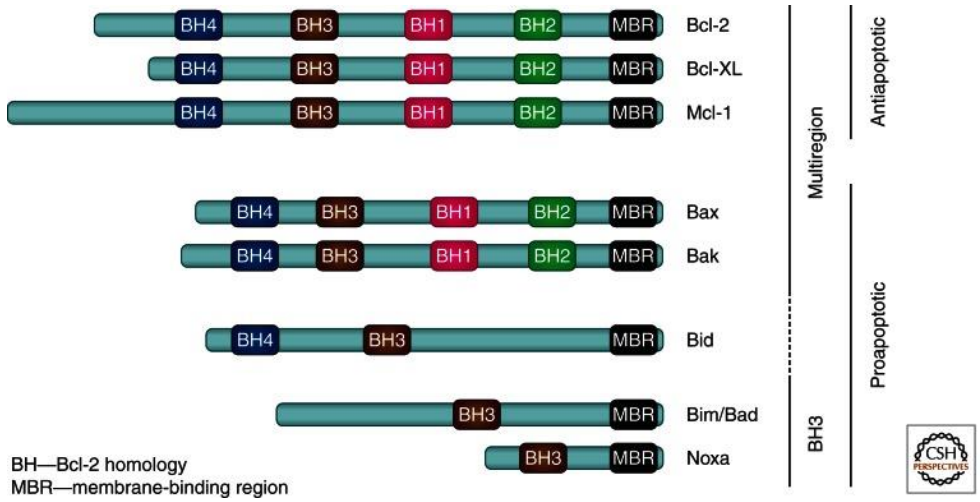
Figure I39 : Représentation schématique des voies d'apoptose intrinsèque et extrinsèque. (Kurokawa and Kornbluth 2009)

associées au cytosquelette telles que l'actine (Mashima, Naito et al. 1999), la β-caténine (Herren, Levkau et al. 1998) ou la gelsoline (Kothakota, Azuma et al. 1997) entrainant un réarrangement du cytosquelette et le bourgeonnement de la membrane plasmique observés durant l'apoptose. Outre les protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette, un grand nombre des substrats des caspases sont des régulateurs de l'apoptose. En effet, on y retrouve plusieurs protéines de la famille des Bcl-2 : Bcl-2 et Bcl-Xl qui sont anti-apoptotiques ainsi que Bid et Bax qui sont eux pro-apoptotiques. La protéine Bcl-2 a été décrite comme étant le premier inhibiteur intracellulaire de l'apoptose (Reed 1998). Autres substrats importants des caspases lors de l'apoptose sont les protéines interagissant avec l'ADN dont DFF-45/ICAD (Tang and Kidd 1998) et PARP (Poly(ADP-Ribose) polymérase) (Chaitanya, Steven et al. 2010). PARP est une protéine nucléaire impliquée dans la voie de réparation de l'ADN. Lorsque des cassures dans l'ADN sont détectées, PARP se lie aux fragments d'ADN simple brin et, après un changement de configuration, commence la synthèse d'une chaîne de poly(ADP-ribose) (PAR) comme signal pour les autres enzymes de réparation à l'ADN (Rouleau, Patel et al. 2010). Lors de l'apoptose, le clivage de PARP n'est pas essentiel à l'exécution de l'apoptose cellulaire mais représente plutôt une signature de mort cellulaire. En effet, le clivage de PARP-1 est utilisé comme marqueur précoce de mort cellulaire induit par les agents chimiothérapeutiques. PARP-1 est un substrat reconnu par les caspases 3 et 7 au niveau d'un site de clivage consensus DEVD (Chaitanya, Steven et al. 2010, Rouleau, Patel et al. 2010). Le clivage de la caspase 3 et de PARP a donc été utilisé lors de cette thèse comme marqueur de l'apoptose.

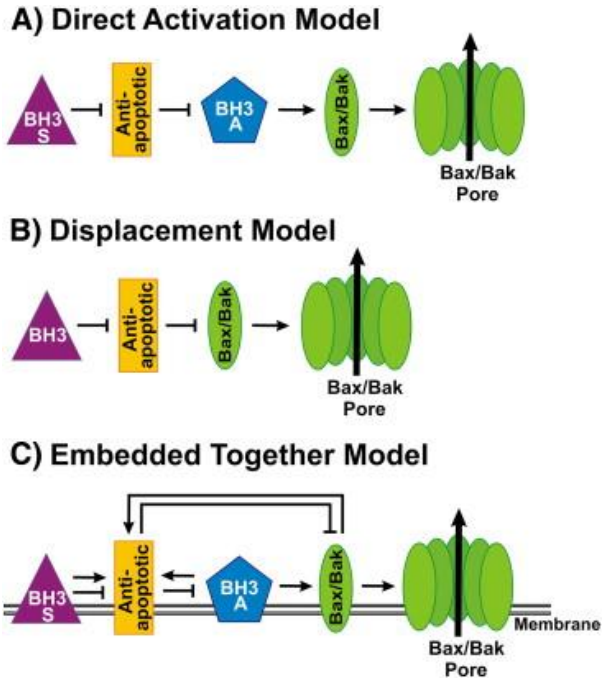
2.3 Les voies de signalisation

2.3.1 Voie intrinsèque de l'apoptose

Le mécanisme d'apoptose est médié par deux voies principales d'activation. La première décrite dans ce chapitre est la voie dite intrinsèque mettant en jeu la mitochondrie (figure I39). Cette voie est gouvernée principalement par des protéines appartenant à la super-famille Bcl-2 : les protéines BH3-only (figure I40). Les protéines BH3-only peuvent être subdivisées en deux groupes distincts : les protéines activatrices (Bim, Bid et Puma) capables de lier toutes les protéines anti-apoptotiques répertoriées et les protéines « senseurs » (Bad, Bik, Bmf, Hrk et Noxa) ayant une affinité pour certaines protéines anti-apoptotiques de façon plus spécifique (Shamas-Din, Brahmbhatt et al. 2011, Shamas-Din, Kale et al. 2013). Ces protéines sont impliquées dans l'activation de deux autres protéines de la famille Bcl-2 : Bax et Bak qui forment alors des oligomères responsables de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Il a été décrit que le cisplatine induisait une modulation pro-apoptotique de Bak dans la lignée cellulaire 224, cellule de mélanome métastatique humain (Mandic, Viktorsson et al. 2001).



<u>Figure I40</u> : Organisation structurelle des membres de la famille Bcl-2. Les protéines de cette famille sont divisées en deux groupes : les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques sont également subdivisées suivant leur fonction, celles qui perméabilisent la membrane externe de la mitochondrie telles que Bax et Bak et celles qui activent l'apoptose en activant Bax et Bak ou en inhibant les protéines anti-apoptotiques telles que Bim ou Bad. Toutes les protéines anti-apoptotiques ainsi que Bax, Bak et Bid possèdent plusieurs régions d'homologie des protéines de la famille Bcl-2 (BH1 à BH4). Cependant, les protéines ne possédant que le domaine BH3 telles que Bim, Bad et Noxa sont appelées BH3 only et sont intrinsèquement déstructurées. La plupart des protéines de la famille Bcl-2 possède un domaine de fixation aux membranes (MBR) permettant leur ancrage dans la membrane externe des mitochondries ou la membrane du réticulum endoplasmique. (Shamas-Din, Kale et al. 2013)



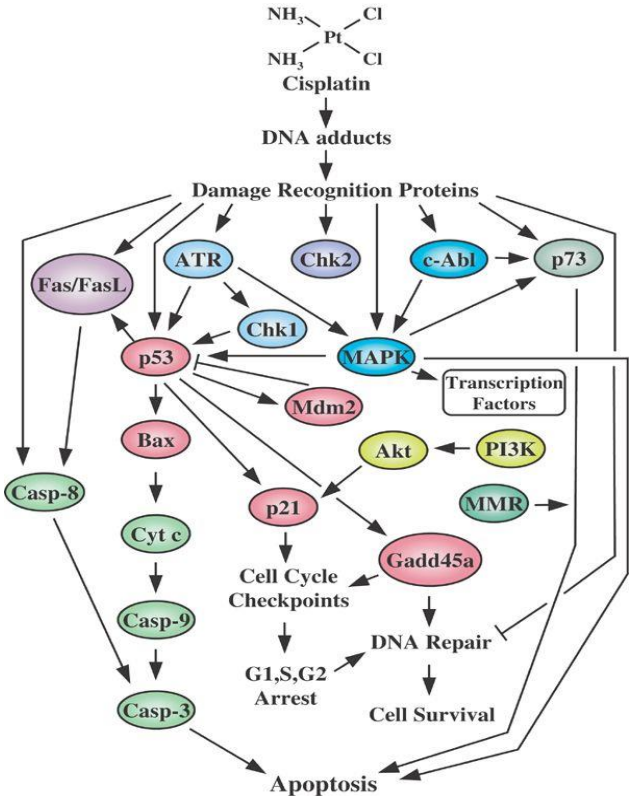
<u>Figure I41</u> : Modèles de régulation de Bax et Bad par la famille de protéines Bcl-2. Le modèle A propose que les protéines sensibilisatrices de la famille BH3 only activent l'apoptose par activation des protéines Bax et Bak. Le modèle B propose une activation constitutive des protéines Bax et Bak qui sont alors activées par inhibition des protéines anti-apoptotiques. Le modèle C est une combinaison des modèles A et B. (Shamas-Din, Brahmbhatt et al. 2011)

Les membres du groupe de protéine BH3-only sont des senseurs de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'activation de ces protéines peut être régulée par de nombreuses voies. Par exemple, les protéines BH3-only sont régulées par des modifications post-traductionnelles. C'est le cas de Bad, qui, lorsqu'il est phosphorylé par Akt, est séquestré par 14-3-3, ce qui empêche sa fonction de protéine pro-apoptotique (Puthalakath and Strasser 2002) ou de Bax empêchant alors la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome c (Simonyan, Renault et al. 2016).

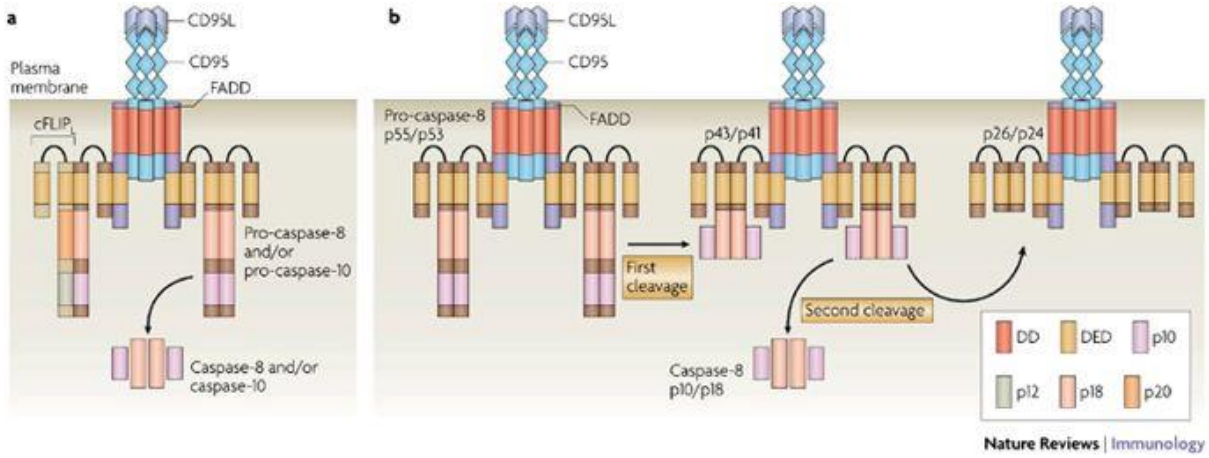
Plusieurs mécanismes d'activation de Bax et Bak par les protéines BH3-only ont été proposés (figure I41) :

- Le modèle de dérépression ou de déplacement : dans ce modèle, Bax et Bad sont constitutivement activées et doivent donc être inhibées pour ne pas déclencher l'apoptose.
- Le modèle d'activation direct : Bax et Bak sont activées par des protéines BH3-only puis elles s'oligomérisent de façon à activer l'apoptose. En absence de stress, les protéines anti-apoptotiques inhibent l'apoptose en séquestrant les protéines BH3-only.
- Le modèle « Embedded together » : Ce modèle est un mélange des deux modèles précèdent. En effet, les protéines Bax et Bak sont constitutivement activées. Les protéines pro-apoptotiques senseurs se lient aux protéines Bcl-2 anti-apoptotiques entraînant la libération de Bak et Bax. Les protéines activatrices jouent un rôle dans l'insertion de Bax et Bak dans la membrane mitochondriale externe, permettant ainsi la mort cellulaire (Shamas-Din, Kale et al. 2013, Siddiqui, Mukherjee et al. 2015).

Suite à la perméabilisation des membranes mitochondriales externes, des protéines normalement présentes dans l'espace inter-membranaire mitochondrial se retrouvent dans le cytosol. Ces protéines telles que le cytochrome *c*, Smac/Diablo et la sérine protéase HtrA2/Omi favorisent l'apoptose. En effet, comme décrit précédemment, le cytochrome c libéré dans le cytosol participe à la formation de l'apoptosome. Lorsque le cytochrome *c* est libéré dans le cytoplasme, il se lie au domaine WB-40 d'Apaf-1, permettant ainsi l'oligomérisation de la protéine en consommant des molécules d'ATP. De plus, la libération de Smac/Diablo et HtrA2/Omi inhibent la protéine XIAP, protéine inhibitrice des caspases 9, 3 et 7. Etant une caspase initiatrice, l'activation de la caspase 9 entraine le clivage de ses substrats, dont les caspases effectrices 3 et 7, qui à leur tour clivent leurs substrats entraînant les changements morphologiques et la mort de la cellule. Les protéines AIF (apoptosis-inducing factor) et l'endonucléase G sont également libérées dans le cytosol induisant la fragmentation de l'ADN (Tait and Green 2010).



<u>Figure I42</u> : Voies de signalisation activées en réponse aux dommages à l'ADN induits par le cisplatine. Lorsque le cisplatine induit des dommages à l'ADN, la cellule active de nombreuses voies de signalisation permettant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et sa survie. Si la cellule n'arrive pas à faire face à ces dommages, elle activera sa mort par apoptose. (Siddik 2003)



<u>Figure I43</u> : Formation du complexe DISC lors de l'apoptose. (A) Le récepteur de mort, ici CD95 interagit avec le domaine DD (Death Domain) de la protéine adaptatrice FADD suite à la fixation de son ligand, CD95L. Cette protéine adaptatrice possède également un domaine DED permettant de fixer les pro-caspases 8 ou 10 et ainsi de faire le lien entre le récepteur de mort et les pro-caspases. (B) Suite à la formation de ce complexe DISC, les pro-caspases 8 ou 10 sont activées par deux clivages protéolytiques successifs. Les dimères formés sont capables de cliver des dimères adjacents, la protéines c-FLIP$_L$ mais également les caspases effectrices 3, 6 et 7. (Krammer, Arnold et al. 2007)

2.3.2 Voie extrinsèque de l'apoptose

La seconde voie décrite dans ce chapitre est la voie extrinsèque de l'apoptose. Cette voie fait intervenir la liaison d'un ligand à son récepteur. Ces récepteurs de mort cellulaire possèdent un domaine cytoplasmique « Death Domain » ou DD. Il existe huit récepteurs contenant ce domaine DD présents à la membrane plasmique. Parmi ceux-ci, les plus connus sont les récepteurs de la famille TNF (Tumor necrosis factor) auxquels se lient le TNF-α, Fas et TRAILR1. Le domaine DD, en plus d'être présent sur ces récepteurs, peut être retrouvé dans certaines protéines adaptatrices telles que FADD et TRADD. L'initiation de l'apoptose par le couple Fas ligand/Fas récepteur entraine le recrutement de FADD au niveau des domaines de mort du récepteur DD et la formation du complexe DISC comme présenté dans la partie « activation des caspases initiatrices » (Thorburn 2004).

Les dommages à l'ADN induits par le cisplatine peuvent induire la mort cellulaire par les récepteurs Fas (figure I42) et ces derniers sont donc détaillés dans le paragraphe qui suit. L'activation des autres récepteurs ne sera pas abordée.

Il existe 29 récepteurs transmembranaires au TNF, tous caractérisés par un domaine extracellulaire liant un ligand et un domaine intracellulaire permettant l'activation de voies de signalisation. Parmi ces récepteurs, on distingue deux groupes : les récepteurs de mort et les récepteurs activateurs (Locksley et al. 2001). La plupart des récepteurs TNFR sont des récepteurs activateurs qui permettent l'activation du facteur de transcription NF-κB (Nuclear factor κB) ou l'enclenchement de la voie des MAPKs. Les récepteurs de mort, contenant un domaine DD, quant à eux sont au nombre de 8 : TNFR1, FasR, DR3, DR4, DR5, DR6, EDAR, NGFR. Un des couples de ligand/récepteur les plus caractérisés est FasL/FasR (Lavrik, Golks et al. 2005).

La liaison du ligand FasL à son récepteur induit un changement de conformation de ce dernier rendant accessible son domaine DD à la protéine adaptatrice FADD (Scott, Stec et al. 2009). En plus de son domaine DD, FAD contient un domaine DED permettant de faire le lien entre le récepteur de mort et les caspases 8 et 10. La formation du complexe DISC permet alors la dimérisation et l'activation de la caspases 8. Les dimères ainsi formés sont capables de cliver des dimères adjacents, la protéine c-FLIP$_L$ mais également les caspases effectrices 3, 6 et 7. L'activation des pro-caspases 8 nécessite deux clivages protéolytiques successifs, le premier au niveau du peptide linker et le second entre le pro-domaine et la grande sous-unité permettant de libérer le dimère activé du complexe DISC. Le dimère actif libéré peut alors cliver ses substrats, les composés du DISC et les caspases effectrices (figure I43).

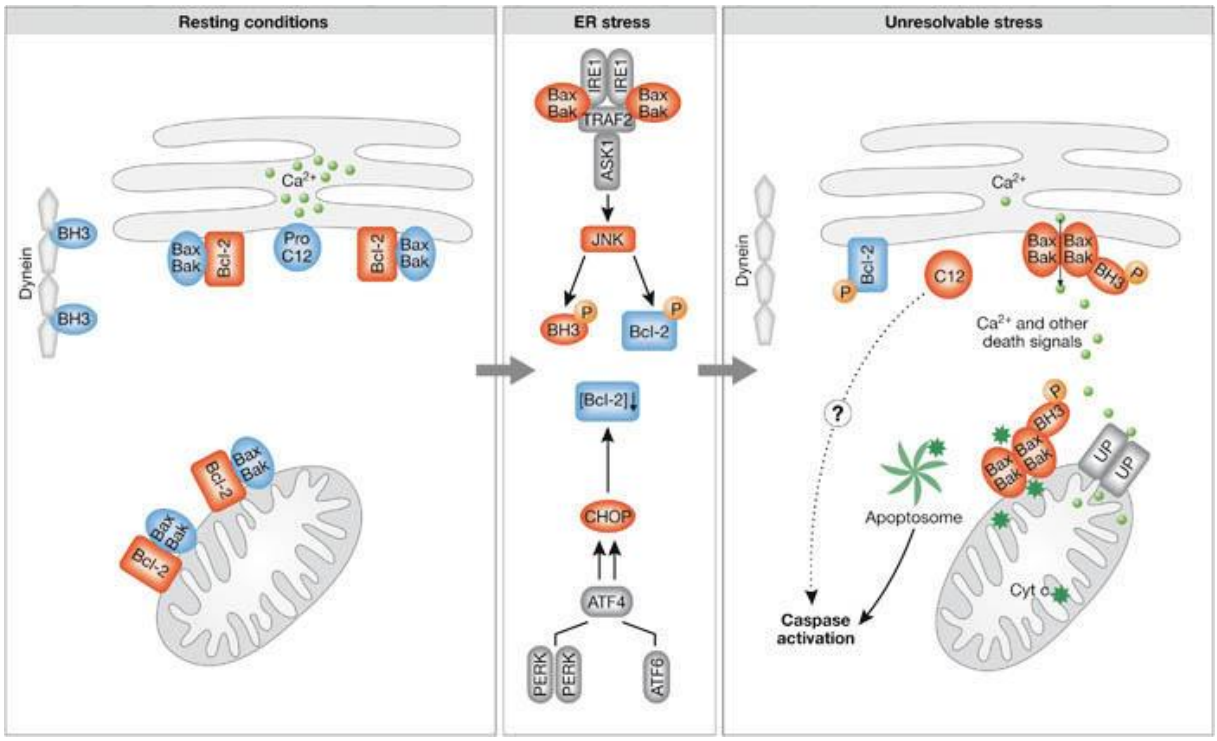


Figure I44 : Activation de l'apoptose par un stress du RE. En absence de stress, les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak sont inactivées via leur activation avec la protéine Bcl-2 au niveau de la membrane des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Un stress du réticulum endoplasmique entraine l'activation de la voie JNK mais également l'induction de l'expression de la protéine CHOP. L'activation de la voie JNK inhibe l'activité anti-apototique de la protéine Bcl-2 par phosphorylation. De plus, CHOP bloque l'expression de Bcl-2. L'ensemble de ces évènements provoque l'activation de Bax et Bak et ainsi l'induction de l'apoptose. (Szegezdi, Logue et al. 2006)

2.3.3 Apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique

L'apoptose peut également être induite suite à un stress du réticulum endoplasmique. En effet, des études ont montré que le réticulum endoplasmique pouvait avoir un double rôle en entrainant soit la survie cellulaire soit la mort cellulaire suite à stress. Les médiateurs de la réponse au stress du réticulum endoplasmique, PERK, IRE1 et ATF6 sont fondamentaux dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Szegezdi, Logue et al. 2006).

L'activation de PERK conduit à la phosphorylation de eIF2 entrainant une inhibition générale de la traduction des protéines dépendante de la coiffe. Cependant, cette atténuation de la traduction n'est pas absolue. En effet, il existe des séquences régulatrices IRES (Internal Ribosomal Entry Site) dans la région 5' de certains ARNm permettant leur traduction, c'est le cas de ATF4 (Schroder and Kaufman 2005). ATF4 est impliquée dans la survie cellulaire en induisant l'expression de gènes dont les produits jouent un rôle dans le métabolisme des acides aminés, les réponses aux stress ou la sécrétion de protéines (Harding, Zhang et al. 2003). Cependant, tous les gènes cibles de ATF4 ne favorisent pas la survie de la cellule. En effet, ATF4 induit l'expression de CHOP (transcription factor C/EBP homologous protein) qui joue un rôle important l'induction d'un signal pro-mort via l'induction de l'expression de gènes pro-apoptotiques (Zinszner, Kuroda et al. 1998). CHOP est également régulé au niveau post-traductionnel par une phosphorylation des résidus sérines 78 et 81 par la kinase p38, augmentant ainsi son activité.

IRE1 pourrait également induire un signal pro-apoptotique via l'activation de la voie de signalisation JNK (c-Jun N-terminal). En effet, une fois activé, IRE1 recruterait la protéine TRAF2 (TNF-Receptor-Associated Factor 2) molécule adaptatrice des récepteurs TNF. Le complexe IRE1-TRAF2 ainsi formé suite à un stress du RE peut recruter la protéine ASK1 (Apoptosis Signal Regulating Kinase 1), protéine de la famille des MAP kinase kinase kinase impliquée dans l'activation des protéine kinases JNK et p38 (Nishitoh, Saitoh et al. 1998). Une surexpression de ASK1 induit l'apoptose dans divers types cellulaires alors que son invalidation chez la souris entraine une résistance des cellules neuronales à la mort cellulaire induite par un stress du réticulum endoplasmique (Nishitoh, Matsuzawa et al. 2002). Ces résultats montrent l'importance de la protéine ASK1 dans la mort cellulaire induite par un stress du RE. ASK1 induirait l'apoptose via l'activation des caspases 8 et 3 et le relargage de cytochrome c par les mitochondries (Hatai, Matsuzawa et al. 2000). Cependant, en 2003, la caspase 12 a été proposée comme caspase clé de l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique (Szegezdi, Fitzgerald et al. 2003). L'activation de JNK entraine la phosphorylation de la protéine Bcl-2 supprimant ainsi son activité anti-apoptotique mais également la phosphorylation de protéines de la famille BH3-only telles que Bim activant son activité pro-apoptotique (Davis 2000).

Malgré l'induction de la protéine CHOP par la protéine ATF6, aucun lien n'a encore été fait entre l'activité d'ATF6 et l'induction de signaux pro-apoptotique. Contrairement à PERK et IRE1, ATF6 a été jusqu'à présent uniquement impliquée dans la survie cellulaire (figure I44).

2.3.4 Voie de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN induits par le cisplatine

Outre l'induction de la mort cellulaire via la voie des récepteurs Fas et via l'activation de la caspase 9 par c-Abl présentées ci-dessus, le cisplatine peut également induire des signaux pro-apototiques par les différentes voies de signalisation activées en réponse aux dommages à l'ADN (figure I42). Ces réponses cellulaires initiées en réponse aux dommages impliquent des acteurs majeurs tels que p53, ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), JNKs (c-Jun N-terminal kinases) et la kinase p38.

p53 est un facteur de transcription crucial dans la réponse aux dommages à l'ADN. Lorsque des dommages à l'ADN sont détectés, l'abondance de la protéine p53 augmente notamment due à la stabilisation de la protéine. L'activation de p53 après induction de dommages à l'ADN a un impact sur de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et l'apoptose tels que p21 (el-Deiry, Tokino et al. 1993), MDM2 (Murine Double Minute 2) (Barak, Juven et al. 1993), Bax (Miyashita and Reed 1995) ou GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage Gene 45) (Kastan, Zhan et al. 1992). En absence de stress, la protéine p53 est rapidement dégradée via l'interaction de la protéine MDM2 au niveau de l'extrémité N-terminale de p53. Cette association entraine alors une ubiquitinylation de p53 suivie de sa dégradation par le protéasome. Plus récemment, il a été montré que la régulation de la stabilisation de MDM2 et donc l'activation de la voie de signalisation p53 été assurée par la protéine NEDD4-1 (Kubbutat, Jones et al. 1997, Xu, Fan et al. 2015). En réponse à des dommages à l'ADN, l'abondance de la protéine p53 augmente.

p53 peut également être phosphorylé au niveau de la sérine 15 par d'autres acteurs majeurs tels que ERK, c-JNK et p38, trois kinases majeures de la voie de signalisation des MAPKs, mais également ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) et ATR (ATM- and Rad3-related protein). Cependant, le cisplatine active préférentiellement ATR (Damia, Filiberti et al. 2001, Zhao and Piwnica-Worms 2001). Persons et al ont démontré qu'une exposition au cisplatine activait les protéines ERK 1/2 et qu'une inhibition de cette protéine entrainait une augmentation de la sensibilité d'une lignée de carcinome ovarien, A2780, au cisplatine. De plus, ils ont montré que ERK 1/2 étaient responsables au moins en partie de la phosphorylation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN induits par le cisplatine. Ces résultats suggèrent que l'activation de ERK par le cisplatine intervient dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN médiée par p53 après une exposition au cisplatine (Persons, Yazlovitskaya et al. 2000, Wang, Martindale et al. 2000). Cependant, les lignées cellulaires de cancer ORL utilisées dans le cadre

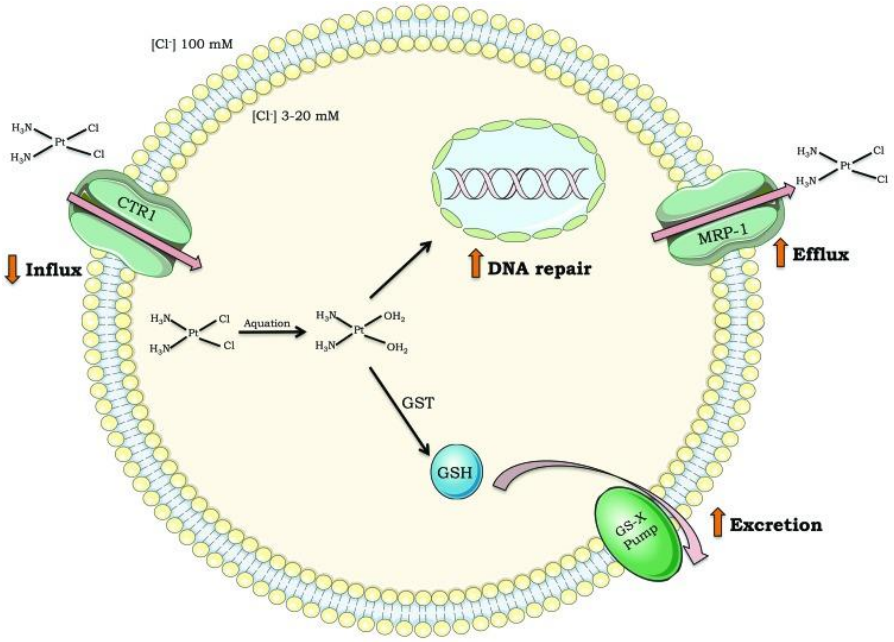
de cette thèse sont mutées pour p53. Dès lors, la voie de signalisation médiée par p53 en réponse au cisplatine n'a pas été investiguée.

Indépendamment des voies précédemment présentées, le cisplatine peut induire l'apoptose via p73. Le niveau d'expression de p73 est fréquemment altéré dans le cancer entrainant une modulation de la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques (Melino, De Laurenzi et al. 2002, Irwin 2004, Vayssade, Haddada et al. 2005). Le rôle de cette protéine dans l'apoptose induits par les agents anti-cancéreux est bien établi (Irwin, Kondo et al. 2003, Ozaki and Nakagawara 2005, Ramadan, Terrinoni et al. 2005).

Il a été démontré, par Bahlani et al, en 2011, que p73 et sa régulation par la voie de la calpaine dépendante du calcium était impliquée dans l'apoptose induite par le cisplatine dans des cellules de cancer des ovaires, OVCA. De plus une dérégulation de la voie de signalisation Ca^{2+}/calpaine/p73 peut être impliquée dans le développement d'une résistance au cisplatine (Al-Bahlani, Fraser et al. 2011).

Conclusion

Les différents points abordés dans ce chapitre ont permis d'éclaircir le mode d'action d'un des agents chimiothérapeutiques les plus utilisés pour lutter contre le cancer, le cisplatine. La compréhension des différentes étapes d'action du cisplatine mais également des voies et acteurs intervenant dans la mort cellulaire induite par cet agent anti-cancéreux est primordiale pour identifier les mécanismes de résistance et ainsi concevoir de nouvelles cibles thérapeutiques.



<u>Figure I45</u> : Représentation schématique des mécanismes de résistance au cisplatine. Ces mécanismes comprennent les voies d'entrée ou de sortie de la drogue en dehors de la cellule, les voies de détoxification du cisplatine mais également les voies de réparation des dommages à l'ADN. (Rocha, Silva et al. 2018)

Chapitre 7 : Mécanismes de résistance au cisplatine

Parmi les traitements utilisés contre le cancer, la chimiothérapie est une des options les plus couramment choisies. Cependant, avec le temps, des résistances à ces traitements apparaissent. Comme mentionné dans l'ensemble de cette introduction, plusieurs paramètres peuvent être impliqués dans cette résistance allant d'une adaptation intrinsèque ou acquise des cellules cancéreuses à l'implication du microenvironnement dont l'hypoxie (Rebucci and Michiels 2013). Les principales voies responsables d'une résistance au cisplatine sont décrites dans ce chapitre (figure I45) (Galluzzi, Senovilla et al. 2012, Shen, Pouliot et al. 2012, Zhu, Luo et al. 2016).

1. Réduction de l'accumulation intracellulaire du cisplatine

Une des plus grandes voies de résistance au cisplatine est la diminution de son entrée dans la cellule. En effet, en diminuant la quantité de l'agent anti-cancéreux au sein de la cellule cette dernière se protège via une diminution des adduits à l'ADN induits par le cisplatine. Il a été montré dès 1996 que la résistance au cisplatine de la lignée cellulaire BEL7404, lignée intrinsèquement résistante au cisplatine, issue d'un cancer du foie provenait d'une diminution de l'accumulation intracellulaire de cet agent chimiothérapeutique. De plus, à partir de cette lignée, les chercheurs ont généré de nouvelles lignées dont la résistance au cisplatine était augmentée et ils ont mis en évidence que l'augmentation de la résistance de ces lignées était associée avec une diminution de l'accumulation de cisplatine au sein des cellules (Johnson, Shen et al. 1996).

Pendant très longtemps, l'entrée du cisplatine dans une cellule était caractérisée par une diffusion passive (Yoshida, Khokhar et al. 1994). Cependant il a été prouvé que l'entrée et la sortie du cisplatine passaient par des transporteurs de cuivre. En effet, l'entrée du cisplatine impliquerait en particulier la protéine CTR1 (Ishida, Lee et al. 2002, Holzer, Manorek et al. 2006) alors que son export serait pris en charge par la protéine ATP7B. Le métabolisme du cuivre fut impliqué en 1993 dans le transport du cisplatine (Jungmann, Reins et al. 1993). Une altération du niveau d'expression, de la localisation et ou de la fonction de CTR1 et ATF7B a été associée à une résistance au cisplatine bien plus tard (Katano, Kondo et al. 2002, Safaei, Holzer et al. 2004, Chen, Song et al. 2008, Ishida, McCormick et al. 2010). Le premier transporteur identifié comme étant associé à la résistance aux thérapies est ABCB1 (ATP-binding cassette transporter). Ce transporteur fonctionne comme une pompe à efflux pour de nombreux agents anti-cancéreux mais pas pour le cisplatine (Gottesman, Fojo et al. 2002, Gillet and Gottesman 2010, Gottesman, Lavi et al. 2016, Robey, Pluchino et al 2018). Cependant, de nombreux chercheurs ont essayé d'identifier des transporteurs analogues qui pourraient être

responsables de la prise en charge du cisplatine et un certain nombre ont pu être décrits tels que les MRPs (efflux ATPases) et les protéines carriers telles que les aquaporines AQP2 et AQP9. La protéine MRP1 est connue pour être impliquée dans la détoxification et la chimioprotection en transportant de nombreux composés, en particulier les métabolites secondaires conjugués à des substances lipophiles avec le glutathion, le glucuronate et le sulfate. Malgré leur action sur la pharmacocinétique de nombreuses drogues, aucune corrélation directe n'a pu être établie pour le cisplatine (Hamaguchi, Godwin et al. 1993, Zelcer, Saeki et al. 2001, Filipits, Haddad et al. 2007). Cependant, une étude réalisée en 2010 a montré qu'une augmentation d'expression et une altération de la N-glycosylation des protéines MRP1 et MRP4 étaient associées à une résistance au cisplatine dans des cellules de cancer ovarien résistantes à l'oxiloplatine (Beretta, Benedetti et al. 2010). Généralement les cellules résistantes au cisplatine ne présentent pas de résistance croisée pour l'oxiloplatine mais les cellules résistantes à l'oxiloplatine sont souvent résistantes au cisplatine.

Il a également été montré qu'une modification de la localisation des protéines FBP et MRP1 mais également qu'une diminution de l'expression de transporteurs associés aux résistances tels que MRP1, MRP2, AQP2 et AQP9 pouvaient être associées à une résistance au cisplatine (Shen, Pastan et al. 1998, Liang, Shen et al. 2003, Hall, Okabe et al. 2008). Ces résultats laissent penser qu'il pourrait exister des voies spécifiques à la prise en charge du cisplatine au niveau de la membrane plasmique pour son import ou son export et qu'une altération de ces voies conduirait à une chimiorésistance.

Comme présenté dans la revue du chapitre 3, l'augmentation de l'abondance de la protéine TMEM205 a été associée à la résistance au cisplatine de cellules issues de carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus sélectionnées suite à une exposition à faible dose de cisplatine. Cette résistance est médiée par la protéine Rab8, une GTPase impliquée dans le recyclage des endosomes et une translocation de la protéine TMEM205 de la membrane plasmique vers la région périnucléaire. Dans ce modèle de chimiorésistance, TMEM205 et Rab8 interviendraient à une étape précoce dans la voie d'action du cisplatine via une séquestration dans de petites vésicules menant à une sécrétion de la drogue à l'extérieur de la cellule (Shen, Ma et al. 2010, Shen and Gottesman 2012). Une autre conséquence de la résistance induite par le cisplatine dans des cellules issues de carcinomes épidermoïdes est la diminution du niveau d'expression et de l'internalisation de la protéine Glut1 (glucose transporter 1), normalement localisée à la surface cellulaire. Liang et al ont montré en 2008 que la diminution de l'entrée du glucose dans la cellule conduirait à une induction de la protéine Sirt1, entrainant alors une résistance au cisplatine. L'altération du métabolisme mitochondrial associée à l'augmentation de l'abondance de Sirt1 accroit la résistance au cisplatine observée dans ces cellules (Liang, Finkel et al. 2008).

Les protéines RhoA, RhoB, RhoC et Rac font partie de la famille des petites protéines Ras. Une diminution d'expression de plusieurs de ces GTPases telles que Rab5, Rac1 et RhoA a été

détectée dans des cellules résistantes au cisplatine, KB-CP20 et 7404-CP20 en comparaison aux lignées parentales non résistantes KB-3-1 et BEL-7404. Cette résistance a été associée à une diminution de l'accumulation de la drogue au sein des cellules (Shen, Liang et al. 2004). La diminution de l'accumulation intracellulaire du cisplatine a également été associée à une réduction de l'expression de GTPases et l'hyperméthylation du gène *FBP* (Folate Binding Protein), tous impliqués dans l'endocytose (Shen, Su et al. 2004). Les protéines de la famille Rho sont, elles aussi, impliquées dans la formation du cytosquelette et dans le trafic des protéines et l'endocytose, suggérant que ces mécanismes peuvent être utilisés comme mécanismes de défense via une modulation de l'accumulation du cisplatine dans la cellule (Shen, Pouliot et al. 2012).

2. *Inactivation du cisplatine*

Une fois le cisplatine entré dans le cytoplasme, il doit être activé par hydroxylation avant d'exercer sa fonction mutagène. Lors de cette étape, un système de détoxification peut inactiver la molécule.

Le glutathion (GSH) est un pseudo tripeptide formé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Le glutathion existe sous deux formes, oxydée et réduite. Cette protéine intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme, mais également dans la détoxification et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène.

Le rôle du glutathion dans la résistance au cisplatine a été investigué dès les années 1990 dans des cellules de carcinome de poumon, GLC4 et une sous-lignée résistante au cisplatine, GLC4-CDDP. Lors de cette étude, le niveau de GSH a été analysé via un monitoring des lignées exposées au cisplatine. Suite à l'exposition au cisplatine, l'abondance de GSH était augmentée dans les cellules GLC4 mais restée inchangée dans les cellules résistantes. Cependant le niveau basal de GSH dans la lignée résistante était augmenté par rapport à la lignée parentale. De plus, une déplétion du peptide GSH dans les cellules résistantes menait à une augmentation du nombre d'adduits à l'ADN formés. Ces résultats mettent en évidence le rôle de détoxification du GSH via une élimination cytosolique du cisplatine menant à une diminution des dommages à l'ADN formés par le cisplatine (Meijer, Mulder et al. 1990). Une autre étude réalisée sur des cellules d'ostéosarcome a révélé qu'une déplétion du glutathion au sein de ces cellules menait à une augmentation de la sensibilité au cisplatine indiquant que la formation d'un complexe entre le glutathion et le cisplatine est un mécanisme de résistance très important (Komiya, Gebhardt et al. 1998). De plus, en 2014, Rocha et al ont montré qu'une déplétion du glutathion dans des cellules de gliome résistantes restaurait la sensibilité au cisplatine (Rocha, Garcia et al. 2014).

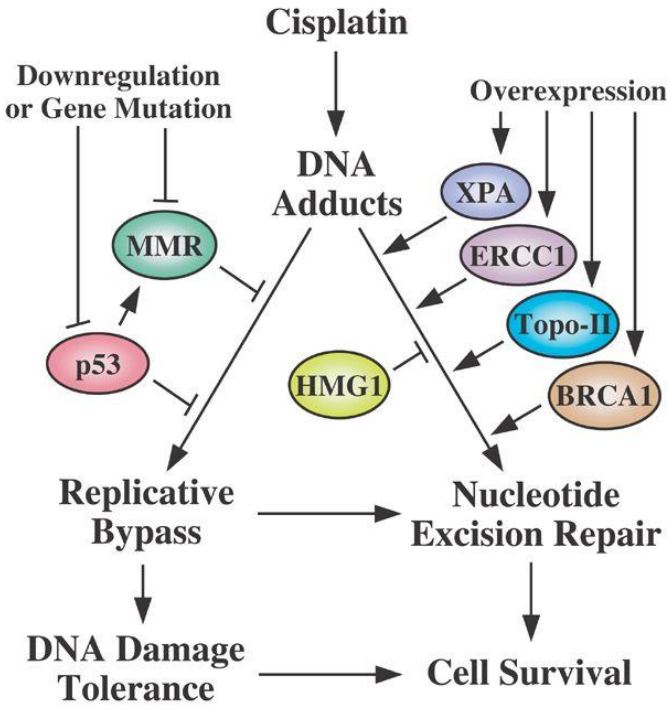


Figure I46 : Acteurs impliqués dans la résistance face aux dommages à l'ADN induits par le cisplatine. Les cellules cancéreuses sont capables de développer des résistances à la mort induite par le cisplatine. Ces mécanismes de résistance font intervenir les voies de réparation des dommages à l'ADN soit une surexpression des protéines impliquées dans les réparations de ces dommages telles que BRAC1 ou ERCC1, soit par une inhibition des protéines MMR ou p53 permettant ainsi de contourner les dommages à l'ADN. (Siddik 2003)

Le glutathion peut également intervenir dans la résistance au cisplatine par un deuxième mécanisme. En effet, MRP2, comme MRP1, peut transporter le glutathion sous forme oxydée, forme dont l'affinité pour le cisplatine est plus importante (Zaman, Lankelma et al. 1995). Plusieurs études ont démontré une interaction directe entre le glutathion et les transporteurs ABC suggérant que le glutathion peut induire un changement conformationnel qui faciliterait le transport de substrat médié par les protéines MRP (Leslie, Ito et al. 2001). Le glutathion peut donc servir de cofacteur facilitant l'interaction entre le cisplatine et la protéine MRP2 et ainsi son transport en dehors de la cellule (Kuo 2009).

3. *Les voies de réparation des dommages à l'ADN*

Le cisplatine est un agent alkylant induisant la mort des cellules cancéreuses principalement suite à la génération de dommages à l'ADN. Les réponses cellulaires initiées en réponse à ces dommages sont complexes et impliquent la détection de ces lésions. Suivant la nature du dommage engendré par le cisplatine, deux mécanismes de réparation principaux présentés dans le chapitre 6 de cette introduction sont sollicités : la réparation par excision de bases (NER) et la recombinaison homologue (RH). De nombreux facteurs contribuent à la résistance au cisplatine mais l'altération des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN est une caractéristique importante dans le développement des chimiorésistances (figure I46) (Martin, Hamilton et al. 2008).

Dans le cas de la voie NER, une augmentation de l'abondance de la protéine ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1) a été corrélée à la résistance au cisplatine dans des cellules issues du cancer des ovaires. En effet, une inhibition de ERCC1 dans des cellules intrinsèquement résistantes au cisplatine entraine une augmentation de leur sensibilité face à l'agent anti-cancéreux (Selvakumaran, Pisarcik et al. 2003). De plus, le niveau d'expression de cette protéine augmente dans des cellules rendues résistantes suite à une exposition au cisplatine (Ferry, Hamilton et al. 2000). Une autre étude a également montré qu'une induction du gène ERCC1 par l'oncogène H-Ras conduirait à une résistance au cisplatine dans le cas du cancer du sein (Youn, Kim et al. 2004).

La seconde voie de réparation des dommages à l'ADN générés par le cisplatine connue pour jouer un rôle dans le développement de résistance est la recombinaison homologue. Cette voie de réparation des dommages double brin fait intervenir deux protéines importantes, BRCA1 et BRCA2. Comme présenté dans le premier chapitre, BRCA1/2 sont des suppresseurs de tumeur retrouvés mutés dans de nombreuses tumeurs. Ainsi, les cancers déficients pour ces protéines ont une meilleure réponse aux agents anti-cancéreux provoquant des dommages à l'ADN tels que le cisplatine. Des études ont révélé que l'acquisition de résistance aux agents à base de

Pathway	Target	Compound
		F06/NERI02
	ERCC1-XPF	E-X PPI2
NER		E-X AS7
	ERCC1-XPA	NERI02
	RPA-DNA	TDRL-551
	RPA	MCI13E
MMR	MLH1	FdCyd
		Decitabine
DDR	ATR	VX-970
		AZD6738
NHEJ	DNA-PKcs	NU7026
		NU7441
HR	Rad51-ssDNA	B02
TLS	PCNA	T2AA
	Revl	Compound 4/5

Figure I47 : Inhibiteurs ciblant les protéines intervenant dans la réparation des dommages à l'ADN. (Rocha, Silva et al. 2018)

platine au sein de tumeurs mutées pour BRCA1/2 passerait par une seconde mutation de ces gènes restaurant l'expression de BRCA1 ou de BRCA2 ainsi que le mécanisme de recombinaison homologue (Sakai, Swisher et al. 2008, Swisher, Sakai et al. 2008, Sakai, Swisher et al. 2009).

Chaque étape des mécanismes de réparation peut jouer un rôle dans le développement d'une tolérance des dommages à l'ADN induits par le cisplatine des cellules cancéreuses. Dès lors le ciblage des différents acteurs pourrait permettre de sensibiliser les cellules résistantes aux différents traitements. Par exemple, une déplétion de MCM8 ou MCM9, protéines clés de la recombinaison homologue permettant le recrutement de RAD51, augmente la sensibilité de fibroblastes de souris au cisplatine (Park, Long et al. 2013). A cette fin, ces dernières années, de nombreux inhibiteurs ont été développés ciblant différentes protéines impliquées dans les voies de réparation des dommages à l'ADN (figure I47) (Rocha, Silva et al. 2018).

4. La survie cellulaire et l'inhibition de l'apoptose

Le cisplatine peut induire la mort cellulaire par apoptose soit par la voie extrinsèque des récepteurs de mort, soit par la voie intrinsèque. Une altération d'un des facteurs qui régule ou exécute l'apoptose peut potentiellement influencer la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques. Un grand nombre de protéines dont les récepteurs de mort, les membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, les caspases initiatrices et effectrices… participent à ce processus et la plupart sont capables de moduler la réponse au cisplatine. Par exemple, une augmentation du niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et MCL1 a été corrélée à une résistance au cisplatine dans le cancer tête et cou, le cancer ovarien et le cancer des poumons (Han, Hong et al. 2003, Erovic, Pelzmann et al. 2005, Williams, Lucas et al. 2005, Michaud, Nichols et al. 2009). Il a également été montré qu'une augmentation de l'abondance de la protéine Bcl-X_L induisait une réduction de l'activation de la caspase effectrice 3 menant à une résistance au cisplatine des cellules HEN-16-2 issues d'un cancer du col de l'utérus (Ding, Yang et al. 2000). Outre ces différents acteurs de l'apoptose, de nombreuses voies de signalisation comprenant la voie p53, la voie des MAPKs, la voie PI3K et la voie NF-κB sont impliquées dans la voie intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose. Une altération de ces voies de signalisation peut mener à une augmentation de la survie cellulaire ou à une inhibition de l'apoptose et *in fine* au développement de résistance au traitement.

4.1 p53

La stabilisation et l'activation de la protéine p53 sont des voies essentielles à la mort cellulaire induite par le cisplatine. Une inactivation de ce gène suppresseur de tumeur est

une caractéristique commune d'une majorité de tumeurs. Dans le cas du cancer des ovaires, les patients présentant une protéine p53 sauvage répondent mieux au traitement que les patients exprimant une protéine p53 mutée (Gadducci, Cosio et al. 2002). De façon surprenante, Fan et al et Hawkins et al ont démontré qu'*in vitro*, une altération de p53 sensibilisait les cellules cancéreuses aux drogues à base de platine plutôt que de les rendre résistantes comme attendu (Fan, Smith et al. 1995, Hawkins, Demers et al. 1996). Un autre membre de la famille de protéine TP53, p63 et plus particulièrement l'isoforme ΔNp63α, a été impliquée dans la survie des cellules exposées au cisplatine (Yuan, Luong et al. 2010).

4.2 La voie des MAPKs

Les MAPKs sont impliquées dans un certain nombre d'évènements de la vie de la cellule, comme la mitose, la différenciation, l'apoptose ou encore la survie cellulaire. Chez les mammifères, il existe trois types de MAPKs : JNK, p38 et ERK. L'activation de ces MAPKs a été associée à la résistance au cisplatine. En effet, une exposition au cisplatine entraine une activation des kinases JNK, p38 ou ERK dans les cellules sensibles au cisplatine alors que cette activation est atténuée dans les lignées résistantes à l'agent chimiothérapeutique. Il a notamment été proposé qu'un échec d'activation de MAPK1 (aussi connue sous le nom de $p38^{MAPK}$) et de JNK en présence de cisplatine entrainerait une résistance au traitement (Mansouri, Ridgway et al. 2003). De plus, une inhibition de ces voies de signalisation diminue la mort cellulaire induite par le cisplatine (Wang, Martindale et al. 2000, Yeh, Chuang et al. 2002, Brozovic, Fritz et al. 2004). Ces résultats suggèrent que l'activation des MAPKs est nécessaire à l'induction de la mort cellulaire en présence de cisplatine et qu'une inhibition de ces protéines peut mener à une résistance. Cependant, contrairement à la voie de signalisation p53, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence chez les patients.

4.3 La voie PI3K/Akt

La voie PI3K/AKT est une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire, la prolifération, l'apoptose et l'angiogenèse. Cette voie de signalisation est le plus souvent activée par le biais d'un récepteur membranaire à tyrosine kinase lui-même stimulé par un facteur de croissance membranaire ou par une cytokine. La fixation d'un ligand à son récepteur entraine le rapprochement de deux récepteurs, leur dimérisation et leur activation par transphosphorylation. La partie intracellulaire des récepteurs sert alors de station d'amarrage à certaines protéines intracellulaires, comme PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase), qui est à son tour activée. PI3K peut également être activée par l'intermédiaire de la protéine Ras, elle-même activée par mutation ou par un de ces récepteurs. PI3K participe à la formation

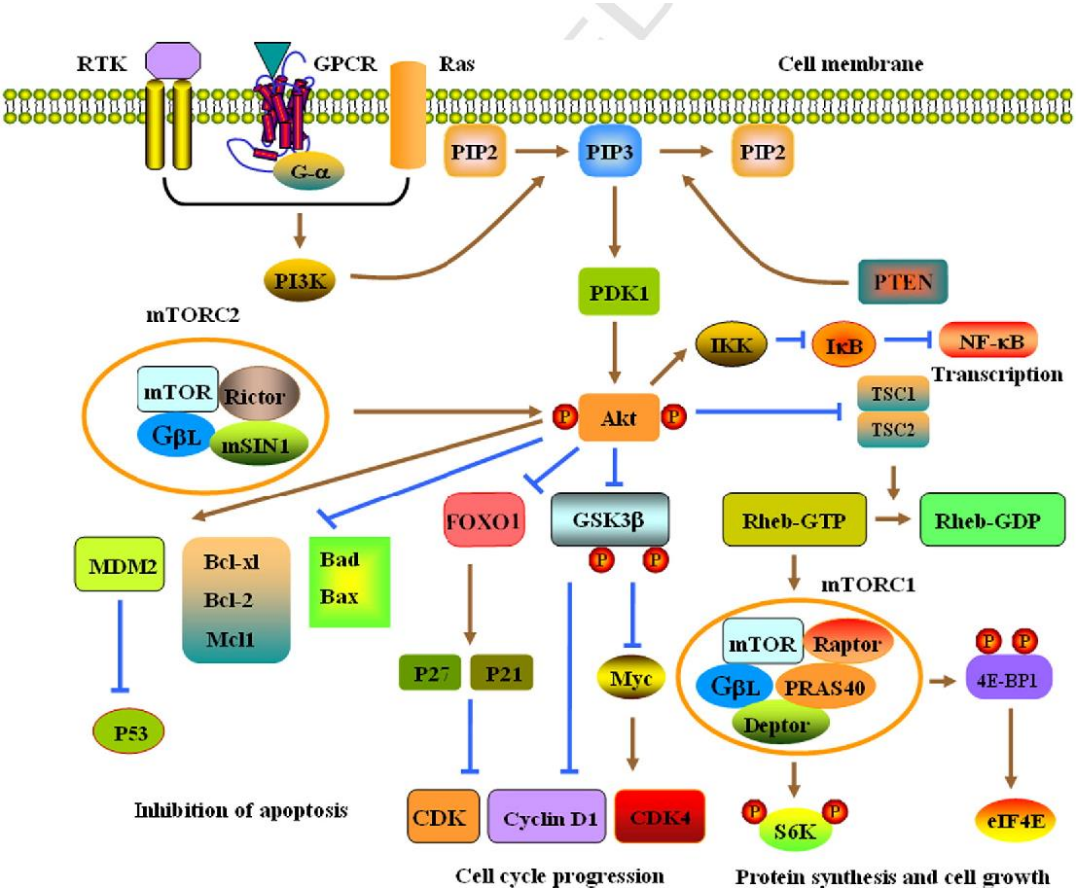


Figure I48 : Représentation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Cette voie de signalisation est activée soit par le biais d'un récepteur membranaire à tyrosine kinase lui-même stimulé par un facteur de croissance membranaire ou par une cytokine, soit par la protéine Ras. Après activation par transphosphorylation, la partie intracellulaire des récepteurs sert alors de station d'amarrage pour différentes protéines intracellulaires, comme PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase). PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Ce composé recrute alors la sérine/thréonine kinase Akt à proximité de la membrane plasmique, où elle est phosphorylée. Akt est un proto-oncogène, qui une fois activé, agit sur de nombreuses cibles dont Bax et Bad inhibant la mort cellulaire par apoptose. (Zhang, Yu et al. 2015)

d'un composé lipidique membranaire, le PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Ce composé recrute alors la sérine/thréonine kinase Akt à proximité de la membrane plasmique, où elle est phosphorylée et activée. Akt est un proto-oncogène qui a de nombreuses cibles dont Bax (figure I48) (Zhang, Yu et al. 2015). L'interaction entre Akt et Bax empêche ce dernier d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale, le relargage du cytochrome c et donc l'activation de la caspase 9 durant l'apoptose (Simonyan, Renault et al. 2016).

Messina et al ont mis en évidence, en 2004, qu'une inhibition de la protéine Ras affectait la réponse au cisplatine dans un modèle de xénogreffe de gliome chez la souris. Le signal pro-survie produit par la protéine Ras était essentiellement médié par une inhibition du clivage de la caspase 9 par la voie PI3K/Akt (Messina, Leonetti et al. 2004). De plus, une augmentation de l'abondance de la survivine, protéine inhibitrice des caspases fréquemment surexprimée suite à une exposition au cisplatine via la voie PI3K/Akt, a été inversement corrélée à la réponse au cisplatine et à la survie des patients atteints de cancer gastrique, de cancer de l'œsophage et de cancer du poumon (Ikeguchi and Kaibara 2001, Kato, Kuwabara et al. 2001, Karczmarek-Borowska, Filip et al. 2005, Tang, Luo et al. 2018).

5. *La voie UPR*

Comme décrit précédemment, le cisplatine induit également l'apoptose via un stress du réticulum endoplasmique (Mandic, Hansson et al. 2003, Shi, Tan et al. 2016). Ainsi une dérégulation de la voie de signalisation induite en réponse à ce stress peut moduler la sensibilité des cellules cancéreuses face au cisplatine. Récemment, l'activation de l'UPR a été proposée comme acteur de la protection contre la mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques dans plusieurs types de cancer dont le cancer du foie pour lequel une activation de l'UPR est accompagnée d'une résistance à la doxorubicine (Al-Rawashdeh, Scriven et al. 2010) et le cancer du sein pour lequel une activation de l'UPR induit une résistance à la doxorubicine et au 5-flurouracil (Scriven, Coulson et al. 2009). Une étude réalisée par Yan et al en 2015 a montré qu'une diminution de l'activation de la voie UPR dans un modèle d'ostéosarcomes sensibilisait les cellules cancéreuses au cisplatine. De plus, dans ce modèle, un blocage de la voie NF-κB augmente significativement l'apoptose induite par le cisplatine. Ces résultats suggèrent que la voie UPR protège les cellules d'ostéosarcome de la mort cellulaire induite par le cisplatine via une activation de la voie NF-κB (Yan, Ni et al. 2015). Le rôle protecteur de l'UPR face au cisplatine a également été mis en évidence dans un modèle de cancer du foie, via la régulation de l'autophagie. Cet effet cytoprotecteur est notamment médié par la protéine HSP27 impliquée dans la régulation de l'autophagie (Chen, Dai et al. 2011).

L'UPR est un acteur majeur du maintien de l'homéostasie du RE et intervient donc dans la survie cellulaire, la croissance tumorale, mais également la chimiorésistance. Dans le contexte du cisplatine, l'activation de l'UPR peut mener à la mort cellulaire, mais également intervenir dans le développement de résistance au traitement. La balance pro-survie/pro-mort de la voie UPR dans le cancer va dépendre de la nature du stress, de son intensité et du type de cancer.

6. Autres voies de résistance

6.1 Les facteurs de transcription

Depuis peu, l'importance des facteurs de transcription dans la résistance au cisplatine a été mise en avant. Parmi ces facteurs, nous retrouvons par exemple NF-κB, Ets-1, HOXD8 ou STAT3 qui régulent des voies de signalisation cruciales dont la dérégulation peut conduire à la formation de tumeur (angiogenèse, réparation des dommages à l'ADN, prolifération, système immunitaire…)

NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. Son activation, par la libération de sa protéine inhibitrice (IκB), déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau. Ainsi son activation est généralement associée à la résistance des cellules cancéreuses face aux agents chimiothérapeutiques y compris le cisplatine. C'est le cas pour le cancer du côlon et de la prostate pour lesquels une inhibition de NF-κB par l'Obovatol accentue les effets du traitement au cisplatine (Lee, Cho et al. 2009). Plus récemment, des résultats similaires ont été obtenus dans le cas du cancer de la vessie où la combinaison du cisplatine avec le Zyflamend, préparation à base de plante inhibitrice de NF-κB, restaure la sensibilité au cisplatine des cellules résistantes (Xue, Yang et al. 2018).

Un autre facteur de transcription important dans la résistance des cellules cancéreuses au cisplatine est Ets-1. Ce facteur de transcription régule notamment l'expression de la protéine PARP-1 impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN (Soldatenkov, Albor et al. 1999). De plus, la fonction de Ets-1 est-elle même régulée par des interactions protéine-protéine en particulier DNA-PK et PARP-1, deux protéines impliquées dans les voies de réparation des dommages à l'ADN (Legrand, Choul-Li et al. 2013). La surexpression de Ets-1 a été corrélée à une résistance au cisplatine dans deux types de cancer, le cancer des ovaires et le cancer colorectal. A la vue de son rôle dans l'activation de la transcription de gène codant pour des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, Ets-1 peut être associé à une résistance au cisplatine via l'activation de transcription de gènes réduisant l'effet cytotoxique du cisplatine (Wilson, Yamamoto et al. 2004).

Deux autres facteurs de transcription ont été associés très récemment à une résistance au cisplatine. Le premier, HOXD8, fait partie de la famille de gènes Homeobox dont le rôle dans le développement, la division cellulaire, l'adhérence, la prolifération et l'apoptose est très important. Une étude réalisée par Sun et al en 2018 a révélé que HOXD8 serait potentiellement associé à une résistance au cisplatine dans le cancer des ovaires (Sun, Song et al. 2018). Le second, STAT3, a également était impliqué dans la résistance des cellules du cancer des ovaires au cisplatine. En effet, l'inhibition de la fixation de STAT3 à la molécule d'ADN restaure la mort cellulaire induite par le cisplatine dans des cellules résistantes (Huang, Liu et al. 2018).

Viennent s'ajouter aux facteurs de transcription, des cofacteurs de transcription dont les protéines HAT (Histone Acetyltransferase), régulateurs de la transcription. En effet, ces enzymes sont associées à l'activation de la transcription de par leur action sur le remodelage et la décondensation de la chromatine. Parmi ces protéines, PCAF (p300/CBP-Associated Factor), a été associée à la résistance au cisplatine dans des cellules de cancer de la prostate (PC3) et de cancer épidermoïde du col de l'utérus (HeLa). La surexpression de cette protéine entrainerait l'expression et la stabilisation de E2F1, qui à son tour, activerait l'expression du gène codant pour la survivine et conférerait ainsi une résistance aux agents chimiothérapeutiques. De plus, la diminution du niveau d'expression de PCAF1 conduirait à la diminution d'abondance de E2F1, à un arrêt du cycle cellulaire et à une augmentation de la sensibilité des cellules aux agents anti-cancéreux (Hirano, Izumi et al. 2010).

6.2 Heat shock proteins

Les "Heat shock proteins" sont des chaperonnes moléculaires abondamment exprimées dans de multiples compartiments cellulaires notamment en condition de stress. Ces protéines régulent l'homéostasie cellulaire de façon à protéger les cellules contre l'apoptose. Les HSP10, HSP60, HSP90 et bien d'autres, exprimées en réponse à un stress, ont été associées à des résistances aux traitements (Mandic, Hansson et al. 2003, Shan, Liu et al. 2003, Zhao and Houry 2005). De plus, une augmentation de l'abondance de HSP27, HSP70, HSP72, GRP78, et HSP90 a été corrélée à la résistance au cisplatine dans les modèles de cancer ovarien (Arts, Hollema et al. 1999), de cancer du sein (Vargas-Roig, Gago et al. 1998), de cancer du côlon (Belfi, Chatterjee et al. 1999) et dans des cellules de carcinome laryngé (Brozovic, Simaga et al. 2001). Cependant, une augmentation de l'abondance de HSP27 dans des cellules de cancer du sein augmente la résistance à la doxorubicine mais pas au cisplatine (Zhang and Putti 2010). Dans le cas de la protéine HSP10, il a également été décrit qu'une surexpression de cette protéine était liée à la résistance au cisplatine de la lignée KB-3-1. Seulement les mécanismes moléculaires impliqués restent méconnus (Shen, Liang et al. 2006). Ces résultats soulignent

que les mécanismes de résistance mis en place en réponse au cisplatine sont très variés et différents en fonction du type de cancer.

6.3 Protéines ribosomales

Le ribosome joue un rôle essentiel dans l'assemblage structural des protéines. En condition de stress, les ribosomes aident la cellule à coordonner l'expression de gènes en réponse au stress. Le niveau d'expression de certaines protéines ribosomales est dérégulé dans le cancer. C'est le cas de la protéine ribosomale P0 dont l'abondance est diminuée dans les cellules de cancer du sein MCF-7 (Smith, Welham et al. 2007). La protéine ribosomale L36 a, quant à elle, été associée au développement de résistance au cisplatine dans des cellules de carcinome humain (Shen, Liang et al. 2006). En 2010, une autre protéine ribosomale, L37, a été corrélée à une résistance au cisplatine dans des cellules d'ostéosarcome, U2OS. En effet, une exposition au cisplatine conduit à une dégradation de la protéine L37 et à un arrêt du cycle cellulaire. De plus, une surexpression de L37 est capable d'atténuer les dommages l'ADN induit par le cisplatine (Llanos and Serrano 2010). Ces résultats suggèrent que les dommages à l'ADN générés par le cisplatine peuvent engendrer un stress ribosomal et que les mécanismes mis en place pour lutter contre ce stress peuvent mener à une résistance au cisplatine.

6.4 Les microARNs

Les microARNs, régulateurs traductionnels, régulent de nombreux processus en réponse au cisplatine (Drayton 2012). Par exemple, la surexpression du miR-181 a été corrélée à la résistance au cisplatine de cellules de cancer du col de l'utérus (Pouliot, Shen et al. 2013). D'autres microARN peuvent quant à eux augmenter la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques. C'est le cas du miR-155 qui supprime l'EMT, diminue la migration, inhibe la prolifération cellulaire et augmente la sensibilité au cisplatine des cellules CaSki issues d'un cancer du col de l'utérus (Lei, Wang *et al*. 2012). Il en est de même pour le miR-214 qui augmente la sensibilité des cellules HeLa au cisplatine en inhibant directement l'expression de la protéine Bcl2l2 et en augmentant l'expression de Bax et des caspases 9, 8 et 3 (Wang, Liu et al. 2013). L'ensemble de ces études met en évidence que les microARN jouent un rôle dans la résistance au cisplatine via une régulation de gènes cibles impliqués dans la prolifération, l'invasion ou la mort cellulaire. Dès lors, ces microARN peuvent être utiles dans le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux.

Conclusion

L'ensemble de ce chapitre décrit les principaux mécanismes de résistance au cisplatine mis en place au sein des cellules cancéreuses. Il faut cependant ajouter à ces voies de signalisation l'impact du microenvironnement tumoral sur la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques et en particulier l'hypoxie. En effet, la néovascularisation anarchique des tumeurs entraine une distribution hétérogène des agents anti-cancéreux au sein de la tumeur. De plus, en condition d'hypoxie, la cellule active la transcription de divers gènes impliqués dans des voies de signalisation en réponse au stress que représente l'hypoxie. Parmi ces gènes, certains entrainent une chimiorésistance, c'est le cas de TMEM45A. Dès lors, l'identification et la compréhension de ces mécanismes de résistance peuvent permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Objectifs

Malgré le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux depuis la fin des années 1970, le cancer reste un problème majeur de santé publique. En effet, même si les traitements par chimiothérapie ont fait leurs preuves, des résistances aux traitements sont parfois présentes dès le début du traitement ou se manifestent au cours du traitement. Les résistances des cellules cancéreuses aux chimiothérapies peuvent être soit intrinsèques aux cellules cancéreuses, soit acquises par mutation suite à des expositions à ces agents anti-cancéreux, soit provenir du microenvironnement tumoral. De nombreux processus ont été associés au développement de résistance aux traitements. Cependant, tous les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses échappent à la mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques ne sont pas connus (Rebucci and Michiels 2013).

Parmi ces mécanismes, le microenvironnement est un acteur majeur du développement de résistance aux traitements et en particulier l'hypoxie. En effet, lorsque les cellules cancéreuses sont privées d'un apport en oxygène adapté, elles activent des voies de signalisation en réponse au stress que représente l'hypoxie. En condition d'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 est stabilisé et induit l'expression d'un large panel de gènes cibles favorisant la croissance tumorale, mais également la résistance aux traitements. Dans ces conditions, TMEM45A a été identifiée comme une protéine induite par l'hypoxie, localisée au niveau du réseau trans-Golgien et impliquée dans la résistance des cellules de carcinome hépatique à la mort cellulaire induite par l'étoposide (Flamant, Roegiers et al. 2012). Dès lors, TMEM45A est une cible potentielle pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cette protéine, dont la fonction est encore inconnue, a été également associée à la différenciation des kératinocytes (Hayez, Malaisse et al. 2014, Hayez, Roegiers et al. 2016).

Le but de cette thèse est d'étudier le rôle de la protéine TMEM45A dans la résistance des cellules cancéreuses à la mort induite par les agents chimiothérapeutiques et d'identifier les mécanismes impliqués dans cette résistance. Afin de choisir un modèle d'étude pertinent, nous avons réalisé un screen du niveau d'expression de TMEM45A dans les tissus tumoraux en comparaison aux tissus sains dans différents types de cancer humains. TMEM45A est surexprimé dans les tissus tumoraux en comparaison aux tissus sains dans le cas du cancer du rein et du cancer de la tête et du cou. Ainsi nous avons étudié l'implication de TMEM45A dans la chimiosensibilité des cellules RCC4 mutées ou non pour pVHL dans le cas du cancer du rein et des cellules SQD9 dans le cas du cancer de la tête et du cou. Pour cela, l'expression de TMEM45A a été invalidée dans ces différentes lignées cellulaires, puis la sensibilité des cellules aux agents chimiothérapeutiques a été étudiée. Dans un second temps, nous avons tenté d'identifier, par des expériences réalisées *in vitro*, par quel mécanisme TMEM45A pouvait être impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses au traitement. L'étude de la protéine TMEM45A a ensuite été prolongée par des expériences *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe de cellules SQD9.

Résultats

Chapitre 1 : Mise au point des modèles cellulaires

Afin d'étudier le rôle de TMEM45A, gène dont l'expression est induite par l'hypoxie, dans la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques, nous avons déterminé les conditions expérimentales optimales à cette étude. Les paramètres à évaluer sont le temps d'incubation des cellules en condition d'hypoxie nécessaire à l'induction de l'expression des gènes cibles de HIF, le temps d'incubation des cellules en présence de l'agent chimiothérapeutique, mais également la concentration de cet agent à laquelle les cellules doivent être exposées pour obtenir 50% de mortalité.

1. Lignée cellulaire CAL27

1.1 Expression des gènes cibles de HIF en condition d'hypoxie

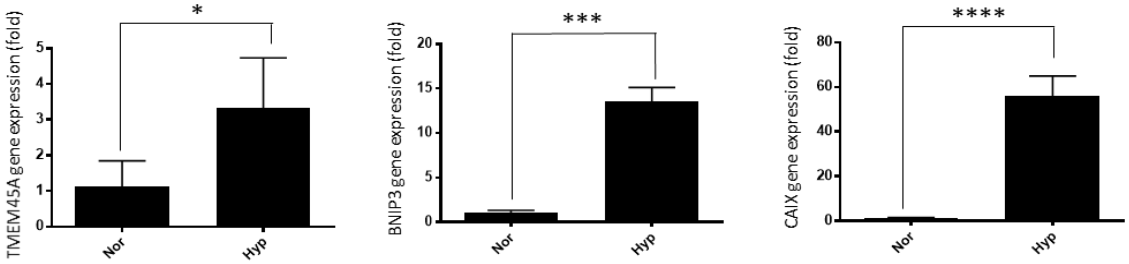
Afin d'analyser le niveau d'expression des gènes cibles de HIF dont *TMEM45A*, les cellules CAL27 ont été incubées en condition de normoxie et d'hypoxie pendant 16h. Après incubation, les ARNm ont été extraits et le niveau d'expression des gènes *TMEM45A, CAIX* et *BNIP3* a été étudié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence (figure R1).

Pour l'ensemble des gènes, l'hypoxie induit une augmentation du niveau d'expression. En effet, les gènes *TMEM45A, BNIP3 et CAIX* sont respectivement 3, 12 et 50 fois plus exprimés en condition d'hypoxie par rapport à la normoxie. Ces résultats permettent de conclure que les conditions d'hypoxie utilisées dans ce travail entrainent bien une expression des gènes cibles de HIF.

1.2 Sensibilité au cisplatine

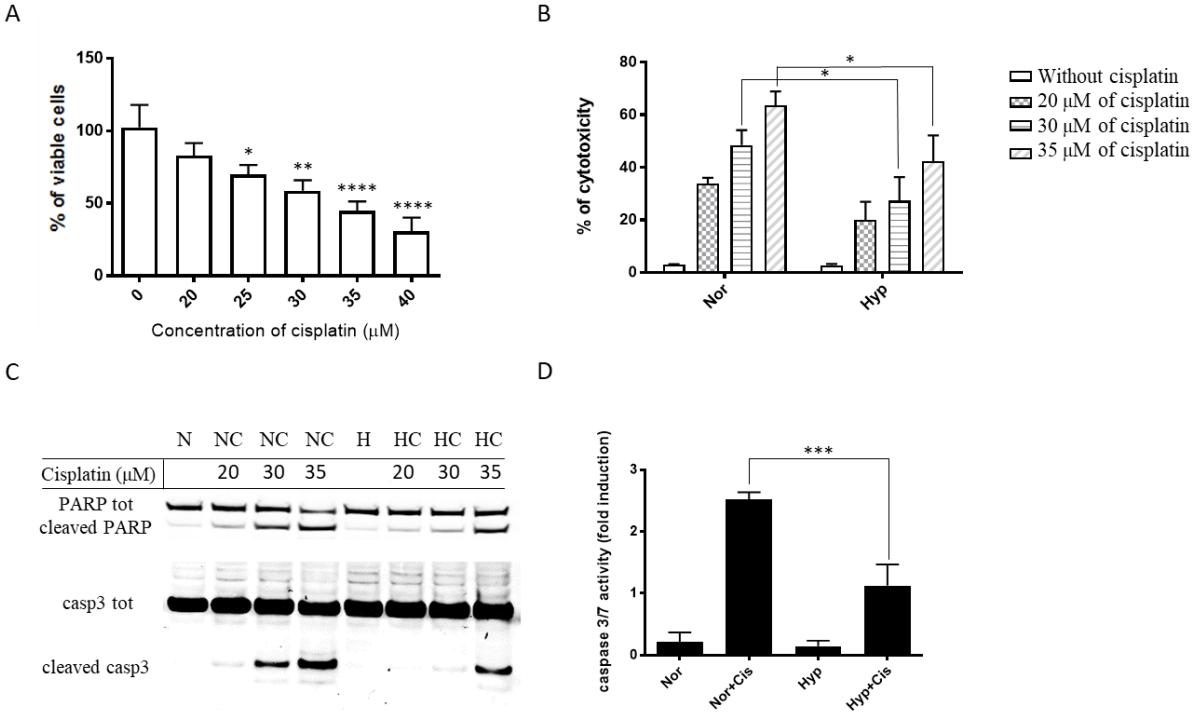
Nous avons par la suite étudié la sensibilité des cellules CAL27 au cisplatine, agent chimiothérapeutique couramment utilisé pour traiter les patients atteints de cancer ORL. Ceci a été réalisé afin de déterminer l'IC50 de ce composé c'est-à-dire la concentration inhibitrice médiane (figure R2).

La sensibilité au cisplatine a été analysée par différents tests, un test de viabilité et un test de cytotoxicité. Le premier test effectué, test MTT, est une méthode colorimétrique permettant



<u>Figure R1</u> : Expression des gènes cibles de HIF en hypoxie dans les cellules CAL27

Les cellules CAL27 ont été incubées 16h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après incubation, les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression des ARNm des gènes *TMEM45A, BNIP3* et *CAIX* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). Nor : normoxie ; Hyp : hypoxie. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un t test non pairé (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).

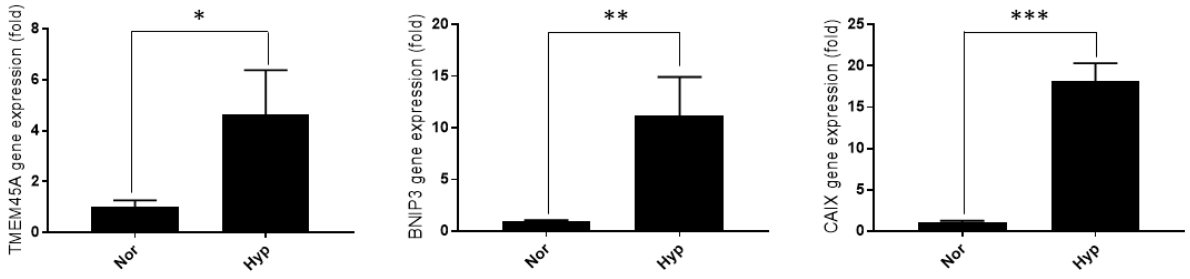


<u>Figure R2</u> : Sensibilité des cellules CAL27 au cisplatine

(A) Les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de cisplatine durant 16h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules incubées sans cisplatine. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (B) Les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de 20, 30 et 35 µM de cisplatine durant 40h en condition de normoxie et d'hypoxie puis la cytotoxicité du cisplatine a été mesurée par test LDH. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (C) Les cellules CAL27 ont été incubées en présence ou en absence de 20, 30 et 35 µM de cisplatine durant 16h en condition de normoxie et d'hypoxie puis le clivage de PARP et caspase 3 a été étudié par western blot (n=1). (D) Les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de 30 µM de cisplatine durant 16h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après lyse des cellules, l'activité des caspases a été quantifiée par la détection de la fluorescence émise par le clivage d'un substrat, le DEVD-AFC. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). Nor ou N : normoxie ; Nor+Cis ou NC : normoxie plus cisplatine ; Hyp ou H : hypoxie ; Hyp+Cis ou HC : hypoxie plus cisplatine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 1 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; ****p<0,0001).

d'évaluer l'activité mitochondriale des cellules vivantes et donc par extension la mortalité induite par un composé. En effet, certaines enzymes intracellulaires sont capables de réduire le sel de tétrazolium en formazan, composé insoluble de couleur violette. Ainsi après solubilisation, la quantité de formazan mesurée est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules et donc à la quantité de cellules vivantes. Les cellules CAL27 ont été incubées en condition de normoxie durant 16h en présence de différentes concentrations en cisplatine. Des temps d'incubation supérieurs entrainaient une mortalité trop importante. Le cisplatine induit une diminution du nombre de cellules vivantes dès 25 μM, cependant l'IC50 n'est atteint qu'entre 30 et 35 μM de cisplatine (figure R2A). Nous avons donc sélectionné ces trois concentrations pour effectuer le second test, test de cytotoxicité. Le test MTT étant basé sur l'activité métabolique des cellules, il ne peut pas être effectué en condition d'hypoxie puisque l'hypoxie entraine un changement du métabolisme des cellules. Ce test ne permet donc pas d'étudier la résistance conférée par l'hypoxie face à la mort cellulaire induite par les agents chimiothérapeutiques. Contrairement au test MTT, le test de cytotoxicité, ou test LDH, peut être réalisé en condition d'hypoxie. Le test de cytotoxicité, est basé sur l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme intracellulaire ubiquitaire qui catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate en présence de NAD+/NADH. Lorsqu'une cellule est endommagée, cette enzyme est libérée dans le surnageant. L'activité de la LDH peut alors être déterminée par une réaction enzymatique avec le sel de tétrazolium INT pour former du formazan de couleur rouge. La quantité de formazan mesurée est directement liée à l'augmentation du nombre de cellules mortes. Un composé est dit cytotoxique s'il entraine au moins 20% de cytotoxicité. Des expériences réalisées au laboratoire ont mis en évidence que les cellules doivent être exposées au moins 40h à un agent chimiothérapeutique afin d'observer au moins 20% de cytotoxicité. Les cellules CAL27 ont donc été incubées en présence de 25, 30 ou 35 μM de cisplatine durant 40h en condition de normoxie ou d'hypoxie. Le cisplatine induit la mort cellulaire des cellules CAL27 proportionnellement à la concentration utilisée. En condition d'hypoxie, la cytotoxicité du cisplatine diminue de façon significative lorsque les cellules sont incubées en présence de 30 ou 35 μM de cisplatine (figure R2B).

Cet agent anti-cancéreux est connu pour induire la mort cellulaire par apoptose. Nous avons donc par la suite étudié par western blot le clivage de deux effecteurs de la mort cellulaire par apoptose, PARP et caspase 3. Les cellules CAL27 ont été incubées en présence de 25, 30 ou 35 μM de cisplatine durant 16h en condition de normoxie ou d'hypoxie. En condition de normoxie, lorsque les cellules sont incubées en présence de cisplatine, nous observons un clivage des deux effecteurs de la voie apoptotique. Ces résultats signifient que le cisplatine induit bien la mort cellulaire par apoptose. En condition d'hypoxie, le clivage de PARP et caspase 3 induit par le cisplatine diminue signifiant que les cellules CAL27 sont protégées par l'hypoxie face à la mort cellulaire induite par le cisplatine. Cette protection est plus importante lorsque les cellules sont incubées 16h en présence de 30 μM de cisplatine (figure R2C). Nous avons donc sélectionné ces conditions expérimentales et validé ces résultats par une analyse de l'activité des caspase 3



<u>Figure R3</u> : Expression des gènes cibles de HIF en hypoxie dans les cellules SQD9

Les cellules SQD9 ont été incubées 24h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après incubation, les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression des ARNm des gènes *TMEM45A*, *BNIP3* et *CAIX* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). Nor : normoxie ; Hyp : hypoxie. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un t test non pairé (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

et 7. Ce test permet de doser l'activité des caspases ciblant la séquence DEVD. Cependant, il n'est pas possible dans ce test de distinguer l'activité des caspases 3 et 7 qui ciblent toutes deux cette séquence. Le test d'activité des caspases est un test fluorométrique basé sur le clivage d'un substrat par les caspases actives libérant un composé fluorescent. Les cellules CAL27 ont été incubées en présence de 30 µM de cisplatine durant 16h en condition de normoxie ou d'hypoxie puis l'activité des caspases a été mesurée. Comme attendu, en présence de cisplatine, l'activité des caspases augmente, signe de mort cellulaire par apoptose. De plus, en condition d'hypoxie, cette activation des caspases diminue montrant bien une protection des cellules CAL27 face à la mort cellulaire induite par le cisplatine en condition d'hypoxie (figure R2D).

En fonction de ces résultats, pour le reste de l'étude, nous avons choisi les conditions suivantes : les cellules CAL27 ont été incubées en présence de 30 µM de cisplatine durant 16h en condition de normoxie et d'hypoxie.

2. Lignée cellulaire SQD9

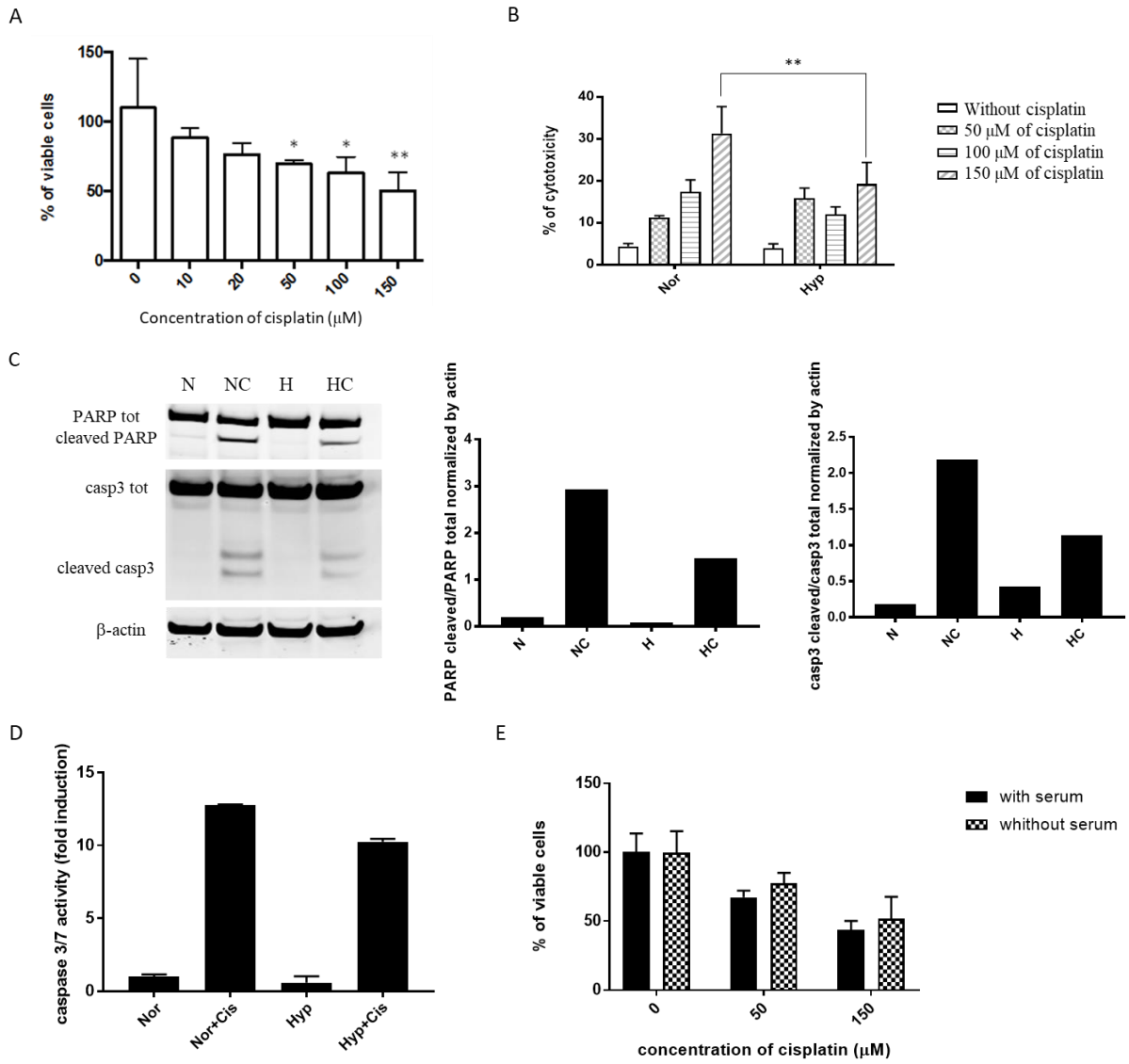
2 .1 Expression des gènes cibles de HIF en condition d'hypoxie

Les expériences réalisées sur les cellules CAL27 ont également été effectuées sur les cellules SQD9. Dans un premier temps, le niveau d'expression des gènes cibles de HIF : *TMEM45A, BNIP3* et *CAIX* a été analysé. Pour cela, les cellules SQD9 ont été incubées en condition de normoxie et d'hypoxie durant 24h. Après extraction des ARNm, le niveau d'expression des trois gènes cibles a été déterminé par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence (figure R3).

L'hypoxie entraine une augmentation du niveau d'expression de *TMEM45A, BNIP3* et *CAIX* avec une augmentation de 5, 11 et 18 fois respectivement en comparaison à la condition normoxie. L'induction de l'expression du gène *TMEM45A* semble être plus importante dans les cellules SQD9 que dans les cellules CAL27. Ces résultats renforcent les informations présentes dans les bases de données selon lesquelles le niveau d'expression de TMEM45A varierait en fonction du type de cancer ORL développé. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces variations pourraient avoir un effet sur la sensibilité au cisplatine de ces cellules.

2.2 Sensibilité au cisplatine

Nous avons ensuite étudié la sensibilité des cellules SQD9 au cisplatine, afin de déterminer l'IC50 de ce composé dans cette lignée cellulaire (figure R4).



<u>Figure R4</u> : Sensibilité des cellules SQD9 au cisplatine

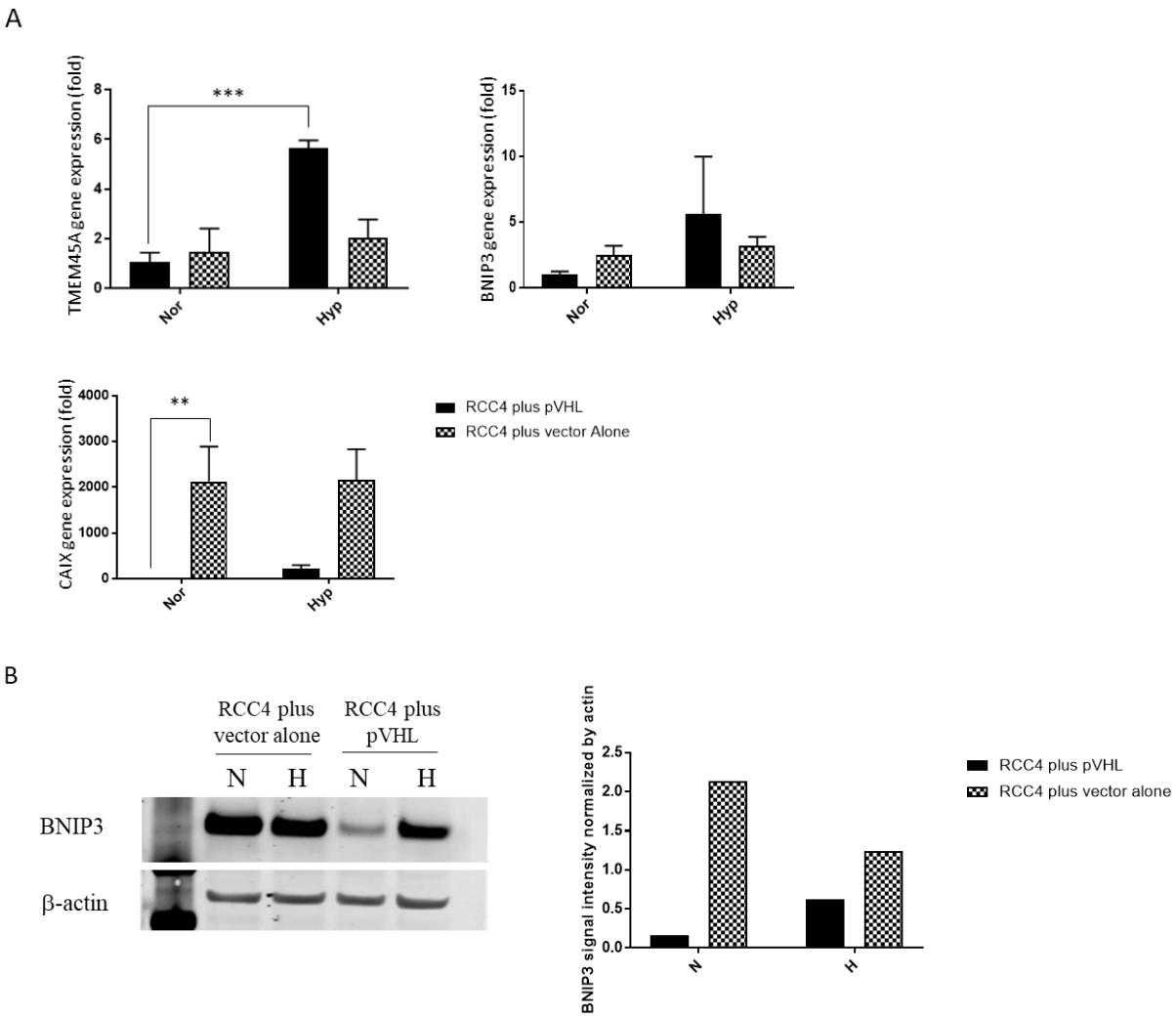
(A) Les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de cisplatine durant 24h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules incubées sans cisplatine. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (B) Les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 50, 100 et 150 µM de cisplatine durant 40h en condition de normoxie et d'hypoxie puis la cytotoxicité du cisplatine a été mesurée par test LDH. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (C) Les cellules SQD9 ont été incubées en présence ou en absence de 150 µM de cisplatine durant 24h en condition de normoxie et d'hypoxie puis le clivage de PARP et caspase 3 a été étudié par western blot (n=1). L'actine est utilisée comme contrôle de charge. (D) Les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 150 µM de cisplatine durant 24h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après lyse des cellules, l'activité des caspases a été quantifiée par la détection de la fluorescence émise par le clivage d'un substrat, le DEVD-AFC. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (E) Les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 50 et 100 µM de cisplatine en absence ou en présence de sérum durant 24h en condition de normoxie et la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour la condition 0. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=2). Nor ou N : normoxie ; Nor+Cis ou NC : normoxie plus cisplatine ; Hyp ou H : hypoxie ; Hyp+Cis ou HC : hypoxie plus cisplatine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 1 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Nous avons réalisé des mesures identiques à celles présentées pour la lignée CAL27. Les cellules SQD9 ont été incubées en présence de différentes concentrations en cisplatine durant 24h et la viabilité des cellules a été analysée par test MTT. Le cisplatine induit une diminution significative de la viabilité cellulaire à partir de 50 μM, cependant, l'IC50 est atteint seulement après une exposition à 150 μM de cisplatine durant 24h (figure R4A). Les cellules SQD9 ont ensuite été incubées en présence de 50, 100 et 150 μM de cisplatine durant 40h en conditions de normoxie ou d'hypoxie afin de déterminer la cytotoxicité du cisplatine par test LDH. Lorsque les cellules sont exposées au cisplatine, la cytotoxicité augmente avec une détection égale ou supérieure à 20% quand les cellules sont incubées en présence de 100 et 150 μM de cisplatine. De plus, la cytotoxicité du cisplatine diminue en hypoxie en comparaison à la normoxie (figure R4B). Afin de confirmer ce résultat, le clivage des deux effecteurs de la voie apoptotique, PARP et caspase 3 a été étudié par western blot. Pour cela, les cellules SQD9 ont été incubées en présence de 150 μM de cisplatine durant 24h en conditions de normoxie et d'hypoxie. En présence de cisplatine, le clivage de PARP est caspase 3 augmente, signe de mort cellulaire par apoptose. Cependant, l'hypoxie confère une protection face à la mort cellulaire induite par le cisplatine (figure 4C). L'activité des caspases a également été étudiée dans ces conditions. Le cisplatine induit bien une activation de la caspase 3, activation qui semble diminuer en hypoxie (figure R4D). L'ensemble de ces résultats nous indique que les cellules SQD9 sont moins sensibles que les cellules CAL27 au cisplatine mais qu'elles sont elles aussi protégées par l'hypoxie contre la mort cellulaire induite par le cisplatine.

Dans une étude publiée en 2004, Cui et al met en évidence que la présence de sérum dans le milieu de culture peut influencer le niveau d'expression des protéines liées à l'apoptose et donc altérer l'induction de l'apoptose (Cui, Jeong et al. 2004). De plus, des expériences réalisées au sein du laboratoire ont mis en évidence que la présence de sérum dans le milieu de culture pouvait moduler la sensibilité des cellules aux agents chimiothérapeutiques. Nous avons donc testé dans le cas des cellules SQD9, l'effet du sérum sur la sensibilité au cisplatine par test MTT. La présence de sérum semble sensibiliser légèrement les cellules SQD9 au cisplatine. Même si aucune modification significative n'a été observée, nous avons décidé de réaliser l'entièreté de nos expériences sans sérum (figure R4E).

3. Lignées cellulaires RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL

Comme présenté dans le chapitre 4 de l'introduction, dans une majorité de cancer rénal à cellules claires, le gène suppresseur de tumeur *pVHL* est retrouvé muté. L'absence de la protéine pVHL fonctionnelle entraine une stabilisation de HIF-1α et une activation constitutive du facteur de transcription HIF1 menant à un état pseudo-hypoxique des cellules cancéreuses en normoxie. Nous avons donc choisi comme modèle la lignée cellulaire RCC4 mutée pour pVHL et transfectée avec un vecteur vide (RCC4 plus vector alone) et la lignée cellulaire RCC4



<u>Figure R5</u> : Expression des gènes cibles de HIF en hypoxie dans les cellules RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL

Les cellules RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL ont été incubées 24h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après incubation, les ARN totaux et les protéines ont été extraits. (A) Le niveau d'expression des ARNm des gènes *TMEM45A, BNIP3* et *CAIX* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (B) L'abondance de la protéine BNIP3 a également été étudiée par western blot (n=1). L'actine est utilisée comme contrôle de charge. Nor ou N : normoxie ; Hyp ou H : hypoxie. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 2 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

restaurée pour pVHL via une transfection stable d'un vecteur comprenant la séquence codante du gène *pVHL* (RCC4 plus pVHL).

3.1 Expression des gènes cibles de HIF en condition d'hypoxie

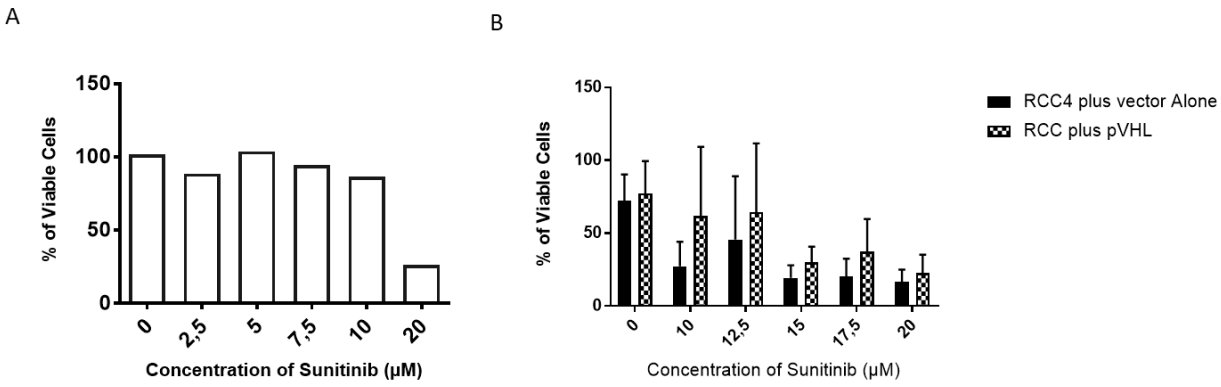
Afin d'analyser si la mutation du gène *pVHL* conférait un état pseudo-hypoxique dans les cellules RCC4, nous avons analysé le niveau d'expression de trois gènes cibles de HIF : *TMEM45A, BNIP3* et *CAIX* dans les cellules RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL après une incubation de 24h en conditions de normoxie et d'hypoxie par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence (figure R5).

Dans le cas des cellules RCC4 plus pVHL, le niveau d'expression de *TMEM45A, BNIP3* et *CAIX* est respectivement 6, 5 et 225 fois plus élevé en hypoxie qu'en normoxie. En revanche, les cellules RCC4 plus vector alone surexpriment deux des trois gènes étudiés, *CAIX* et *BNIP3*, en normoxie en comparaison aux cellules RCC4 plus pVHL. En effet, en normoxie, le gène *CAIX* est 2000 fois plus exprimé dans les cellules mutées pour pVHL que dans les cellules restaurées pour pVHL (figure R5A). La surexpression de BNIP3 a également été validée au niveau protéique (figure R5B). Cependant, lorsque les cellules mutées pour pVHL sont incubées en hypoxie, aucune augmentation supplémentaire quant au niveau expression de ces gènes cibles n'est observée (figure R5A). De façon surprenante, la mutation du gène *pVHL* n'entraine pas une surexpression du gène *TMEM45A* en normoxie ni en hypoxie. Ainsi dans les cellules RCC4 plus vector alone, la mutation de pVHL ne permet pas de mimer l'augmentation du niveau d'expression de TMEM45A observée en hypoxie dans les cellules RCC4 plus pVHL (figure R5A). L'utilisation de cette lignée mutée pour pVHL perd alors son sens dans le cadre de notre étude sur l'implication de TMEM45A dans la chimiosensibilité.

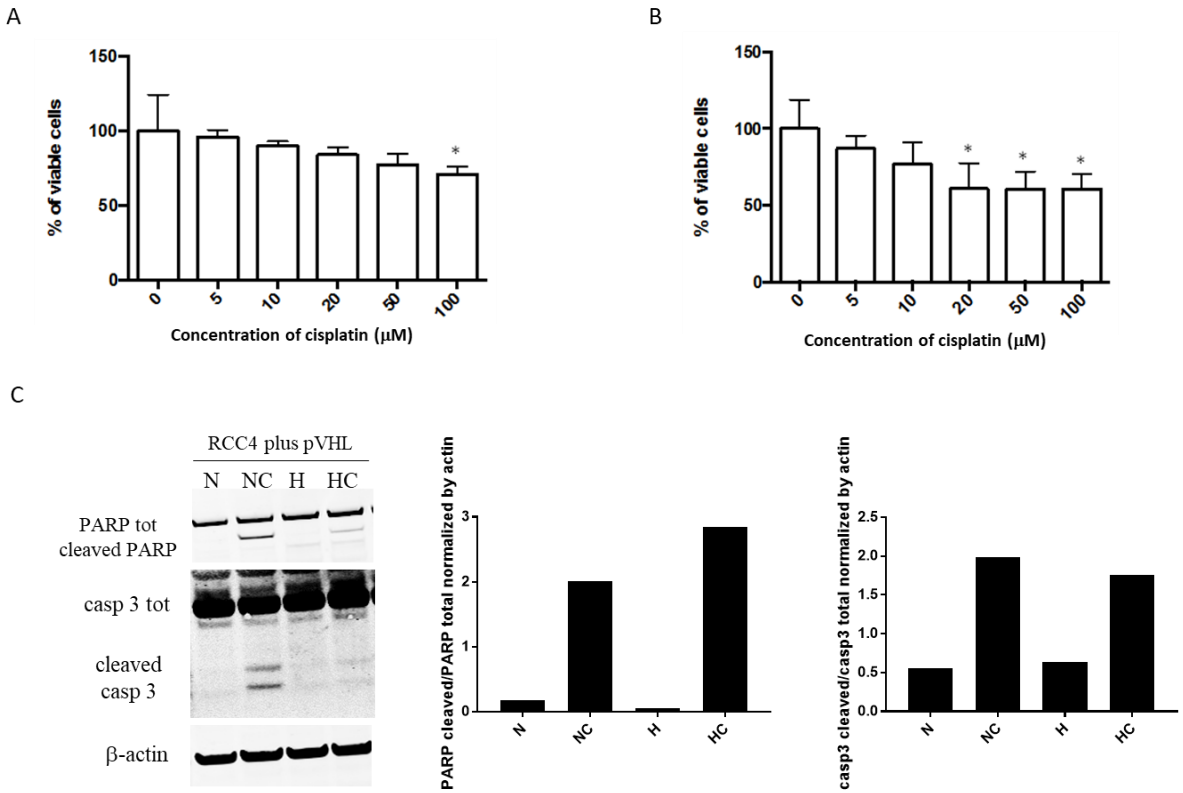
3.2 Sensibilité au sunitinib

De manière similaire aux lignées CAL27 et SQD9, nous avons étudié la sensibilité des cellules RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL au sunitinib, agent chimiothérapeutique couramment utilisé dans le traitement du cancer du rein.

Le sunitinib inhibe des récepteurs à tyrosine kinase impliqués notamment dans la croissance tumorale et la néo-vascularisation de la tumeur. Ainsi, cet agent anti-cancéreux a la propriété de bloquer la prolifération des cellules cancéreuses, on parle alors d'agent cytostatique. Les cellules RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL ont été incubées en présence de différentes concentrations de sunitinib durant 24h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été étudiée par test MTT. A faible concentration, le sunitinib possède un effet cytostatique



<u>Figure R6</u> : Sensibilité des cellules RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL au sunitinib
(A) Les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de sunitinib durant 24h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules incubées sans sunitinib (n=1). (B) Les cellules RCC4 plus vector alone et RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de sunitinib durant 24h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules incubées sans sunitinib. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=2).



<u>Figure R7</u> : Sensibilité des cellules RCC4 plus pVHL au cisplatine

(A) Les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de cisplatine durant 24h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules incubées sans cisplatine. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (B) Les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de cisplatine durant 48h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour la condition 0. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (C) Les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en présence ou en absence de 20 µM de cisplatine durant 48h en condition de normoxie et d'hypoxie puis le clivage de PARP et caspase 3 a été étudié par western blot (n=1). L'actine est utilisée comme contrôle de charge. N : normoxie ; NC : normoxie plus cisplatine ; H : hypoxie ; HC : hypoxie plus cisplatine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 1 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (* $p<0,05$).

(figure R6A). Cependant comme présenté pour les cellules RCC4 plus pVHL dans la figure R6A, à partir de 20 µM, ce composé devient hautement cytotoxique. Nous avons donc réalisé une gamme plus restreinte de concentrations entre 10 et 20 µM. Les cellules RCC4 plus vector alone semblent être plus sensibles que les cellules RCC4 plus pVHL. De plus, les résultats obtenus sont très variables et très peu reproductibles d'expérience à expérience du fait de la haute cytotoxicité de la molécule à ces concentrations (figure R6B). Ne pouvant pas obtenir l'IC50 de façon reproductible avec cet agent chimiothérapeutique, nous avons décidé de tester le cisplatine dans ce modèle. De plus, à la vue des résultats obtenus pour la lignée RCC4 plus vector alone, nous avons choisi de continuer exclusivement sur la lignée RCC4 plus pVHL.

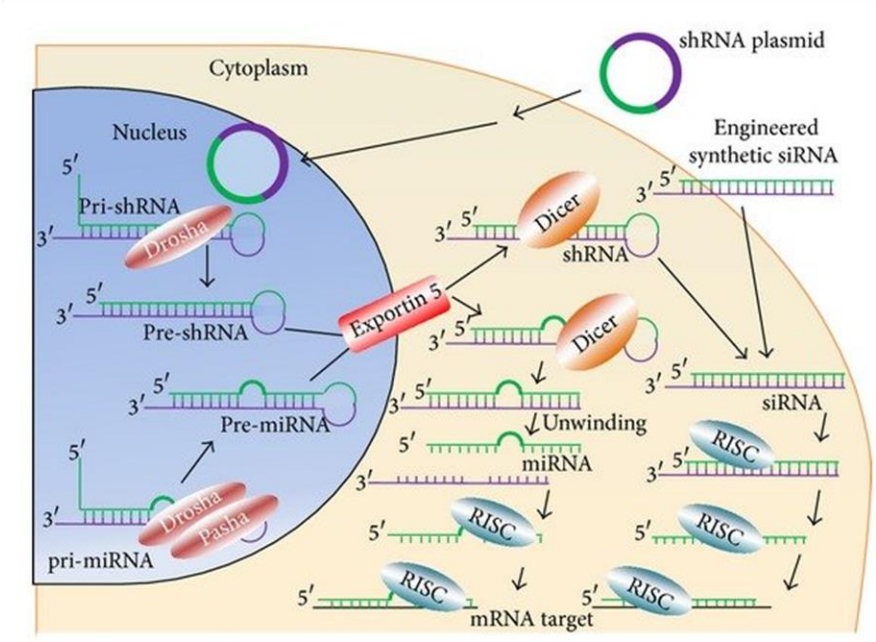
3.3 Sensibilité au cisplatine

Afin de déterminer la sensibilité au cisplatine des cellules RCC4 plus pVHL, les cellules ont été incubées en présence de différentes concentrations de cisplatine durant 24h et la viabilité des cellules a été mesurée par un test MTT. Après une incubation de 24h, une diminution de la viabilité d'à peine 20% est observée lorsque les cellules sont exposées à 100 µM de cisplatine (figure R7A). Les cellules RCC4 plus pVHL ont alors été exposées à la même gamme de concentrations en cisplatine durant 48h. Après 48h d'incubation, le cisplatine diminue la viabilité cellulaire de 40% dès 20 µM. Nous avons donc choisi la plus petite concentration induisant la plus grande diminution de la viabilité cellulaire soit 20 µM durant 48h (figure R7B). Afin de valider l'effet cytotoxique du cisplatine sur les cellules RCC4 plus pVHL, le clivage des deux effecteurs de la voie apoptotique PARP et caspase 3 a été étudié par Western blot. Pour cela, les cellules ont été incubées en présence de 20 µM de cisplatine durant 48h en conditions de normoxie et d'hypoxie. En présence de cisplatine, le clivage de PARP et caspase 3 augmente, et ce clivage est diminué lorsque les cellules sont exposées au cisplatine en hypoxie (figure R7C). Ces résultats signifient que le cisplatine induit l'apoptose des cellules RCC4 plus pVHL et que ces cellules sont protégées de la mort cellulaire induite par cet agent chimiothérapeutique en hypoxie. Pour la suite des expériences, les cellules RCC4 plus pVHL ont été exposées à 20 µM de cisplatine durant 48h.

Conclusion

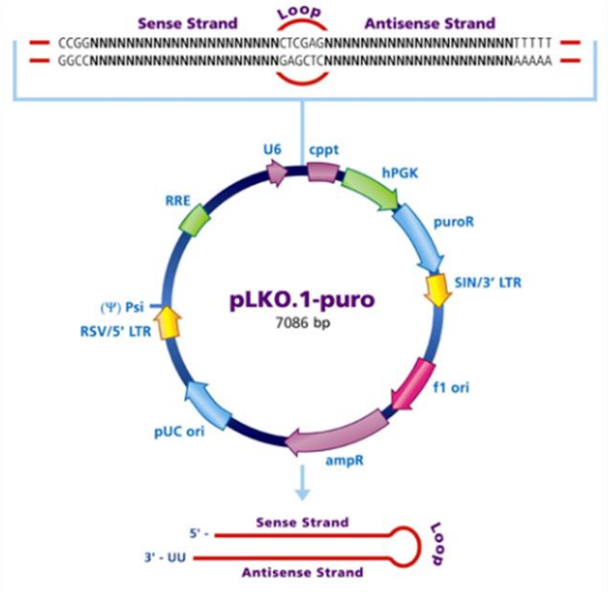
Nos résultats montrent que la sensibilité au cisplatine semble être très différente suivant le type cellulaire. En effet, l'IC50 des cellules CAL27, très sensibles au cisplatine, est atteint après une exposition de 30 µM durant 16h alors que celui des cellules SQD9 est atteint après une exposition au cisplatine de 150 µM durant 24h. Dans le cas des cellules RCC4, résistantes au cisplatine, l'IC50 est à peine atteint après une exposition de 20 µM durant 48h. Dans le cas de

A



(Torrecilla, Rodriguez-Gascon et al. 2014)

B



Name	Description
cppt	Central polypurine tract
hPGK	Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promoter
puroR	Puromycin resistance gene for mammalian selection
WPRE	Woodchuck Hepatitis Post-Transcriptional Regulatory Element
SIN/LTR	3' self inactivating long terminal repeat
f1 ori	f1 origin of replication
ampR	Ampicillin resistance gene for bacterial selection
pUC ori	pUC origin of replication
5' LTR	5' long terminal repeat
Psi	RNA packaging signal
RRE	Rev response element

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/shc002

<u>Figure R8</u> : Système d'invalidation d'expression de gènes par siARN ou shARN

(A) Représentation des mécanismes de maturation des ARN interférents.

(B) Représentation du plasmide codant pour le shARN contrôle ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A contenu dans la particule virale. Le tableau décrit les différents composants du plasmide.

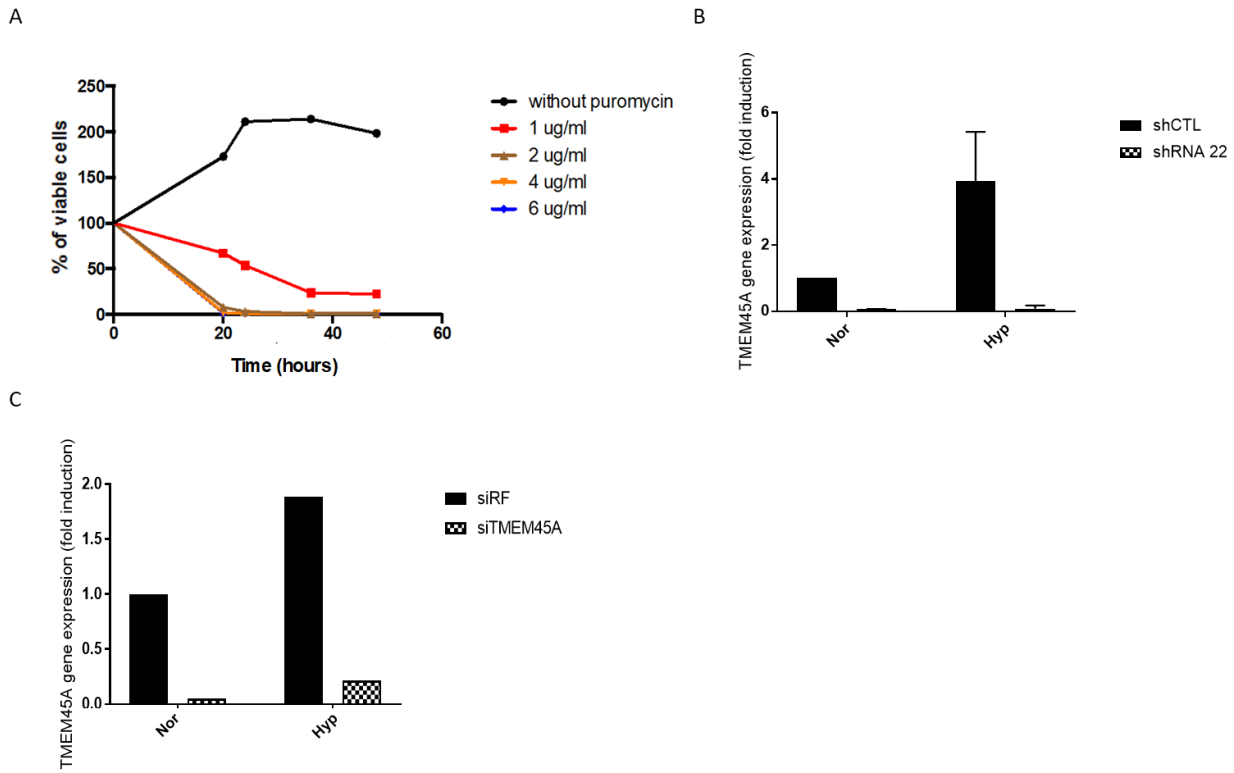
ce modèle, seule l'augmentation du temps d'exposition influence la sensibilité des cellules au cisplatine et non l'augmentation de la concentration de la drogue. Cependant, étant dans un environnement sans sérum, les cellules ne peuvent pas être incubées plus longtemps avec l'agent chimiothérapeutique sous peine d'observer un effet de l'absence de sérum qui pourrait interférer avec celui de l'agent anti-cancéreux. Concernant le niveau d'expression de TMEM45A, les cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL, qui ont un niveau d'expression de TMEM45A semblable, expriment plus TMEM45A que la lignée CAL27. A la vue des résultats sur la chimiosensibilité des différentes lignées cellulaires, nous pouvons nous demander si le niveau d'expression de TMEM45A n'est pas associé à la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine.

4. Invalidation de l'expression de TMEM45A

Afin d'étudier le rôle de TMEM45A dans la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine, l'expression du gène *TMEM45A* a été invalidée par deux techniques d'ARN interférents, les siARN (small interferent RNA) et les shARN (short hairpin RNA). Une des principales caractéristiques des ARN interférents est leur spécificité. En effet, du fait de la complémentarité des bases, un ARN interférent cible spécifiquement un ARNm et s'y hybride de façon à entrainer sa dégradation ou inhiber sa traduction en protéine. La différence majeure entre les deux techniques utilisées ici est la stabilité des invalidations. En effet, dans le cas des siARN la transfection est dite transitoire c'est-à-dire qu'elle ne persiste pas dans le temps et que les siARN ne sont pas transmis aux cellules filles. Dans le cas des shARN, la séquence codante du shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A est insérée dans le génome de la cellule après infection virale, on parle alors de transduction, et sera transmise aux cellules filles.

Les ARN interférents sont pris en charge au sein des cellules par la voie de maturation des microARNs. En effet, une fois dans le cytoplasme, les ARN interférents double brin sont reconnus par le complexe RISC (RNA Induce Silencing Complex) de façon à libérer le brin complémentaire de l'ARNm ciblé. Une fois lié à l'ARNm, l'endonucléase Argonaute (Ago) du complexe RISC coupe le transcrit au niveau du site de reconnaissance. L'ARNm ainsi clivé est rapidement dégradé par des exonucléases. La liaison de l'ARN interférant peut également inhiber la traduction de l'ARNm en bloquant l'accès au ribosome. Les shARN sont produits sous forme d'épingle à cheveux et nécessitent donc une étape de clivage supplémentaire avant d'être pris en charge par le complexe RISC, étape réalisée par la protéine DICER (figure R8A).

La transduction des shARN se fait via une infection avec des particules virales dérivées du VIH. La séquence codante du shARN est alors insérée dans le génome de la cellule cancéreuse de même que la séquence codante d'un gène de sélection, ici la puromycine, afin de sélectionner les cellules infectées et dont le plasmide a été intégré (figure R8B).



<u>Figure R9</u> : Invalidation de l'expression de TMEM45A dans les cellules CAL27

(A) Les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de puromycine durant 24h et 48h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules au temps 0. Les résultats représentent la moyenne (n=2). (B) Les cellules CAL27 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules CAL27 ont été incubées durant 16h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression de l'ARNm du gène *TMEM45A* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=2). (C) Les cellules CAL27 ont été transfectées avec des siARN contrôles (siARN Risc Free = siRF) ou des siARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (siTMEM45A). Après transfection, les cellules CAL27 ont été incubées durant 16h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression de l'ARNm du gène *TMEM45A* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence (n=1). Nor : normoxie ; Hyp : hypoxie.

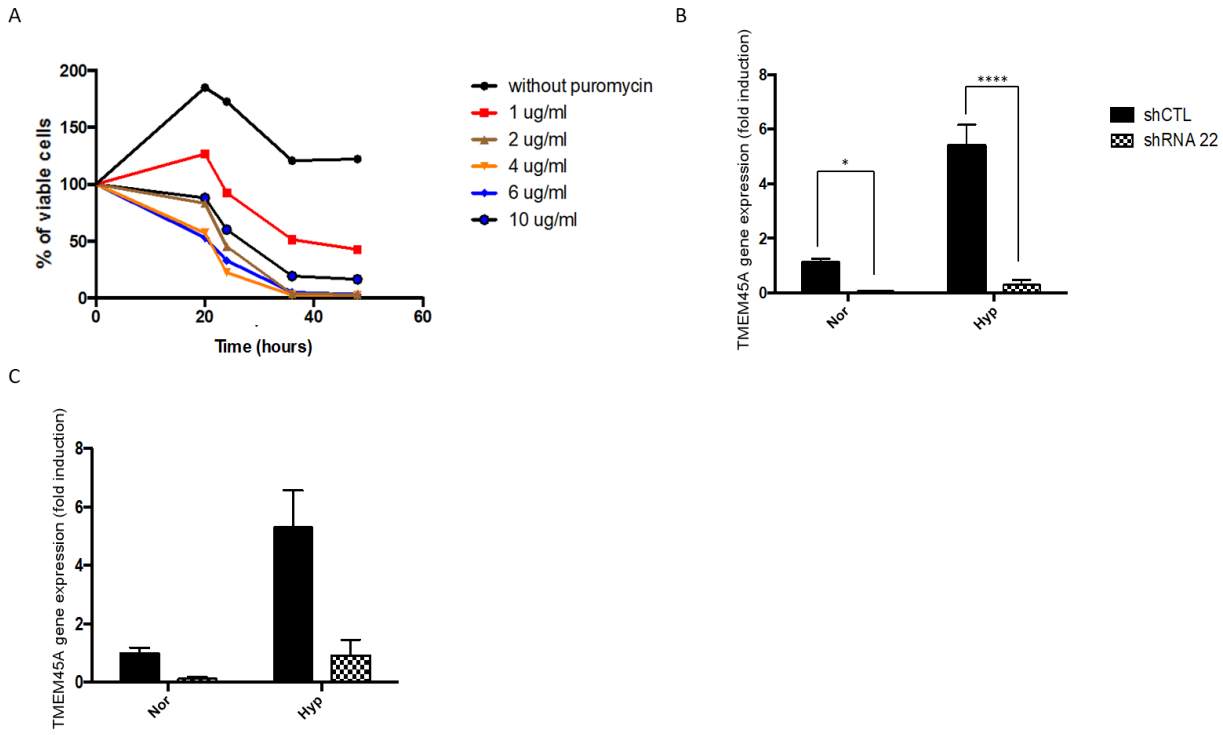
Il est important de déterminer les meilleures conditions permettant une extinction maximale du gène cible, tout en maintenant un niveau satisfaisant de viabilité cellulaire. Ainsi pour l'ensemble des lignées cellulaires, nous avons évalué le niveau d'invalidation du gène *TMEM45A* après invalidation par siARN ou shARN.

4.1 Cellules CAL27

La sensibilité des cellules CAL27 à la puromycine a été étudiée par test MTT afin de déterminer la concentration minimale de puromycine entrainant 100 % de mort cellulaire en 24h à 48h. Cette sélection permettra d'éliminer les cellules non transduites par les particules lentivirales. Les cellules infectées ayant reçu un gène de résistance à la puromycine survivront à ce traitement. Les cellules CAL27 ont été incubées en présence de différentes concentrations en puromycine durant 24h et 48h. Une exposition des cellules CAL27 à la puromycine entraine une diminution totale de le viabilité cellulaire au bout de 24h dès 2 µg/mL de puromycine (figure R9A). Nous avons donc sélectionné les cellules CAL27 transduites par les particules lentivirales avec 2 µg/mL de puromycine.

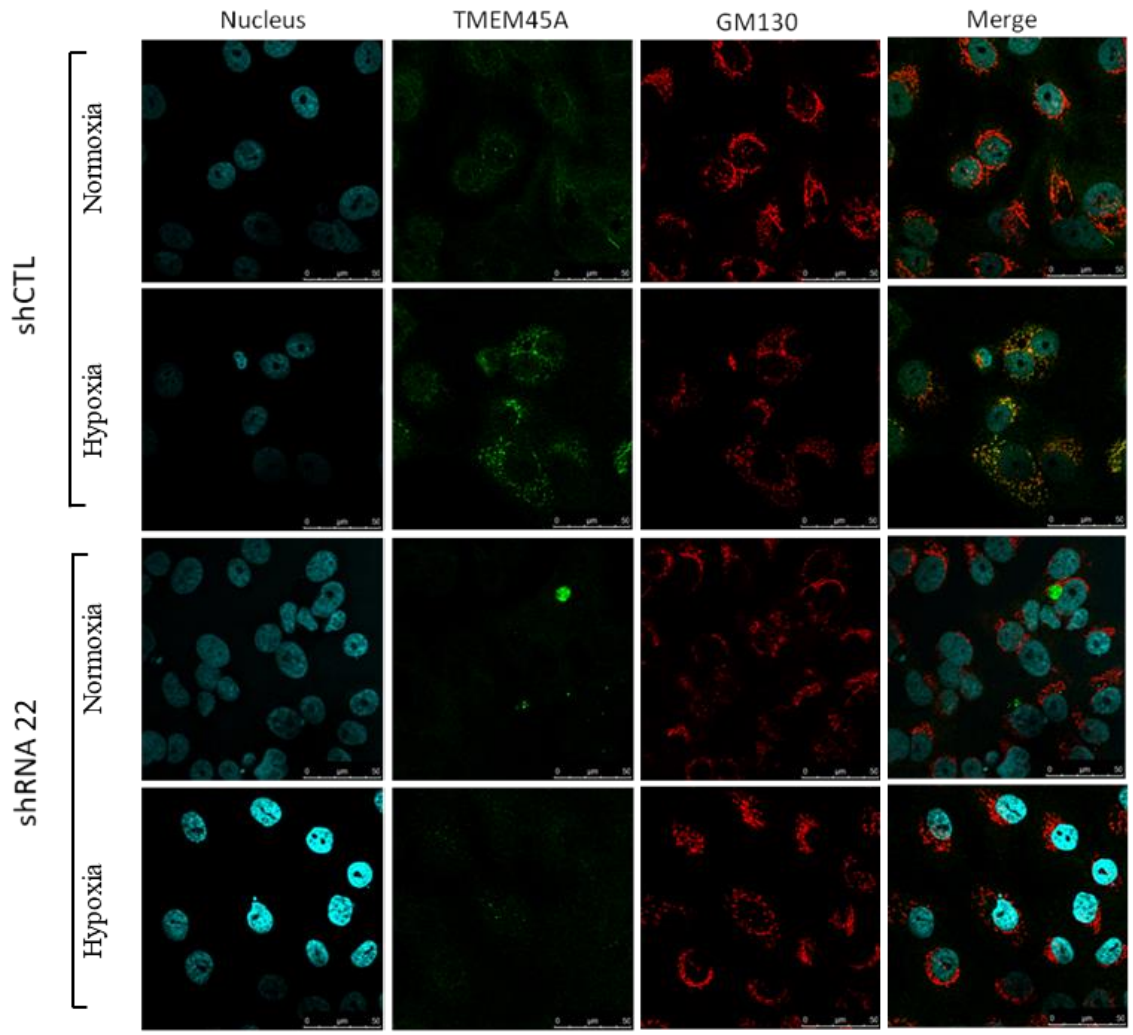
Les cellules CAL27 ont été transduites avec des particules lentivirales comprenant la séquence codante d'un shARN contrôle, shCTL, ou d'un shARN ciblant TMEM45A, le shARN 22. La transduction a été effectuée à une multiplicité d'infection de 5 (MOI 5), c'est-à-dire 5 particules virales par cellule. Après une exposition de 24h avec les particules virales, les cellules sont sélectionnées durant 6 jours à la puromycine avant d'être utilisées pour différentes expériences. Le niveau d'invalidation de TMEM45A suite à la transduction a été analysé par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. L'invalidation de TMEM45A par shARN entraine une forte diminution du niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A en normoxie et en hypoxie (figure R9B).

L'expression de TMEM45A a également été invalidée par siARN. Pour cela, les cellules ont été transfectées à l'aide de siARN contrôle (siRF= siRNA risc free) et de siARN ciblant TMEM45A (siTMEM45A composés d'un pool de cinq siARN différents). Après une exposition de 24h avec les siARN, les cellules sont incubées en condition de normoxie ou d'hypoxie durant 16h afin d'étudier le niveau d'expression de TMEM45A. De façon similaire aux shARN, les siARN ciblant TMEM45A entrainent une diminution importante du niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A en normoxie mais également en hypoxie (figure R9C).

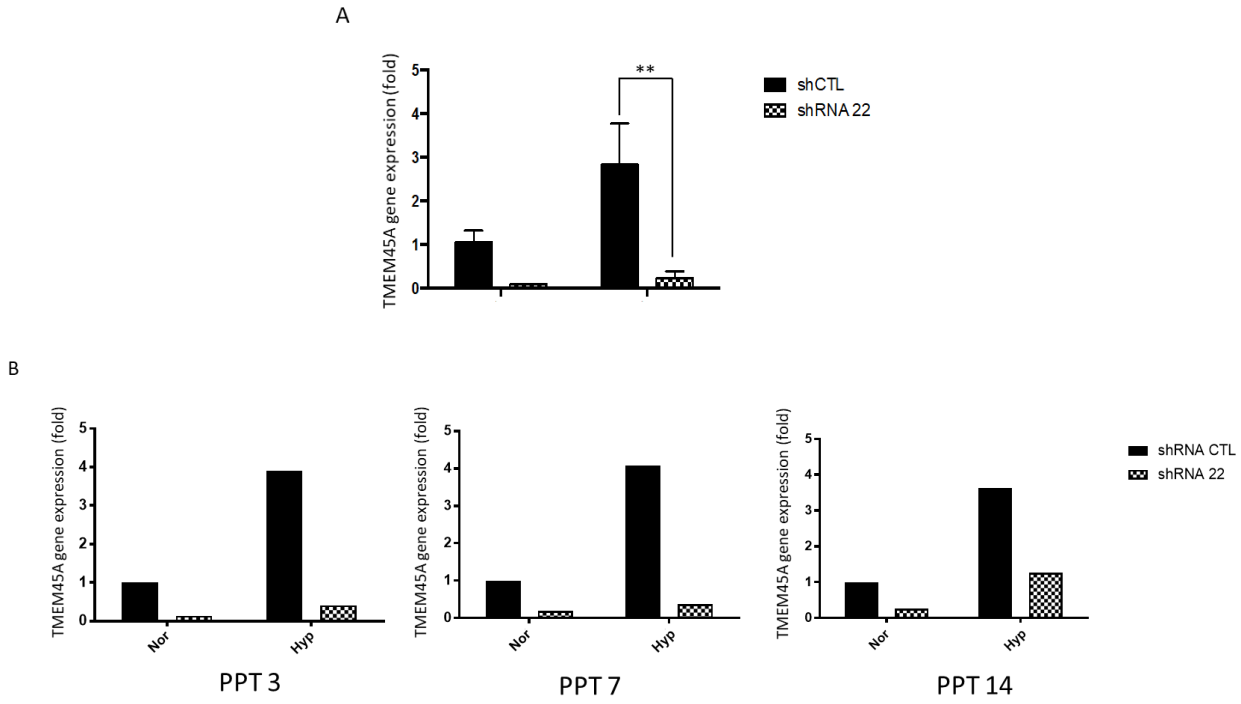


<u>Figure R10</u> : Invalidation de TMEM45A dans les cellules SQD9

(A) Les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de puromycine durant 24h et 48h en condition de normoxie puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules au temps 0. Les résultats représentent la moyenne (n=2). (B) Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été incubées durant 24h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression de l'ARNm du gène *TMEM45A* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (C) Les cellules SQD9 ont été transfectées avec un siARN contrôle (siARN Risc Free = siRF) ou des siARNs ciblant l'ARNm de TMEM45A (siTMEM45A). Après transfection, les cellules SQD9 ont été incubées durant 24h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression de l'ARNm du gène *TMEM45A* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=2). Nor : normoxie ; Hyp : hypoxie. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 2 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (* $p<0,05$; **** $p<0,0001$).



<u>Figure R11</u> : Expression de la protéine TMEM45A dans les cellules SQD9
Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été incubées durant 24h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis l'expression de la protéine TMEM45A (vert) et de la protéine GM-130 (rouge) a été analysée par marquage en immunofluorescence. Les noyaux ont été marqués au Hoescht. Les images ont été prises avec un microscope confocal.



<u>Figure R12</u> : Invalidation de TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL

Les cellules RCC4 plus pVHL ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). (A) Après transduction, les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées durant 48h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression de l'ARNm du gène *TMEM45A* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (B) Le niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A a été étudié à différents passages post-transduction (n=1). Nor : normoxie ; Hyp : hypoxie. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 2 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (** $p<0,01$).

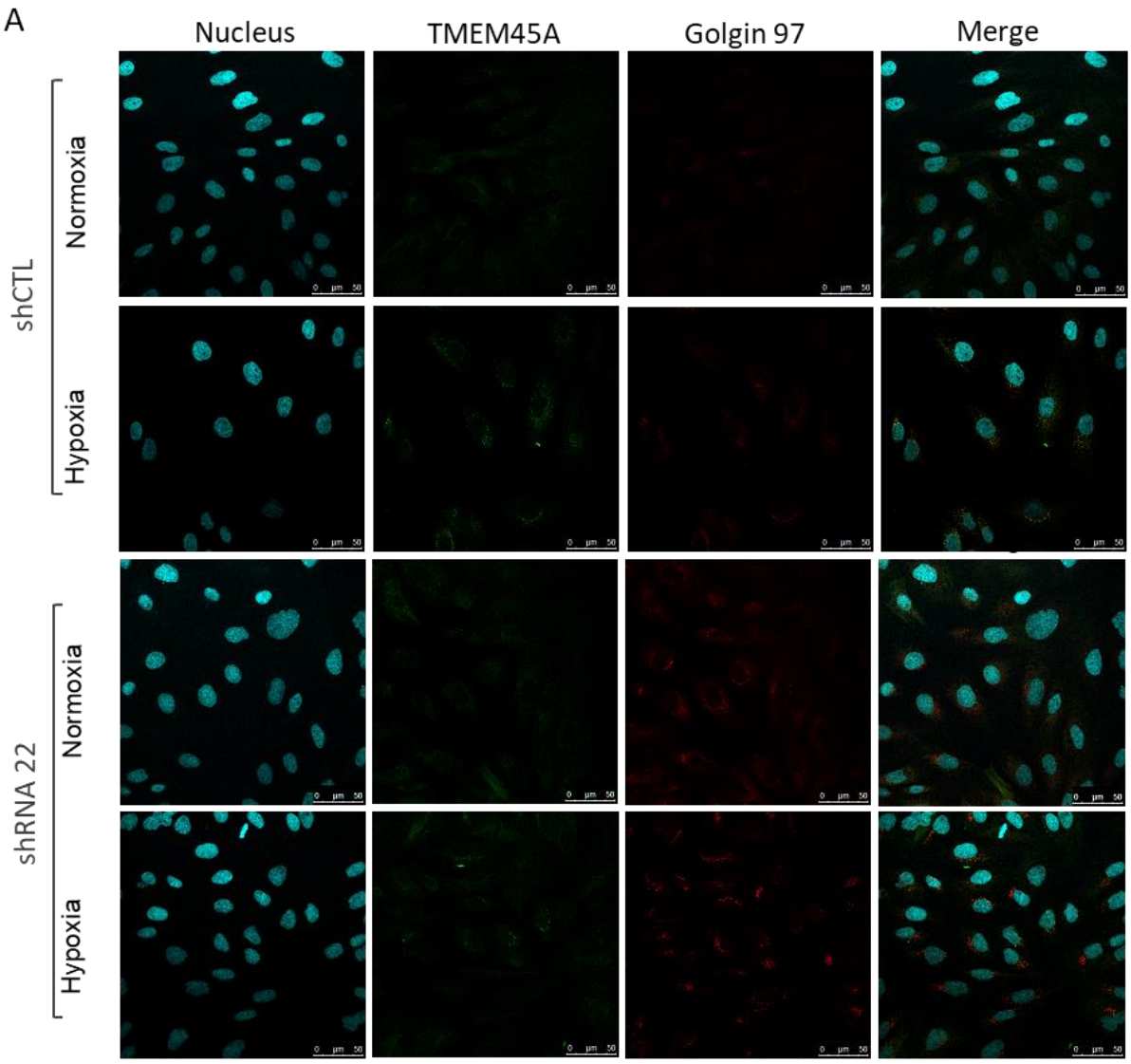
4.2 Cellules SQD9

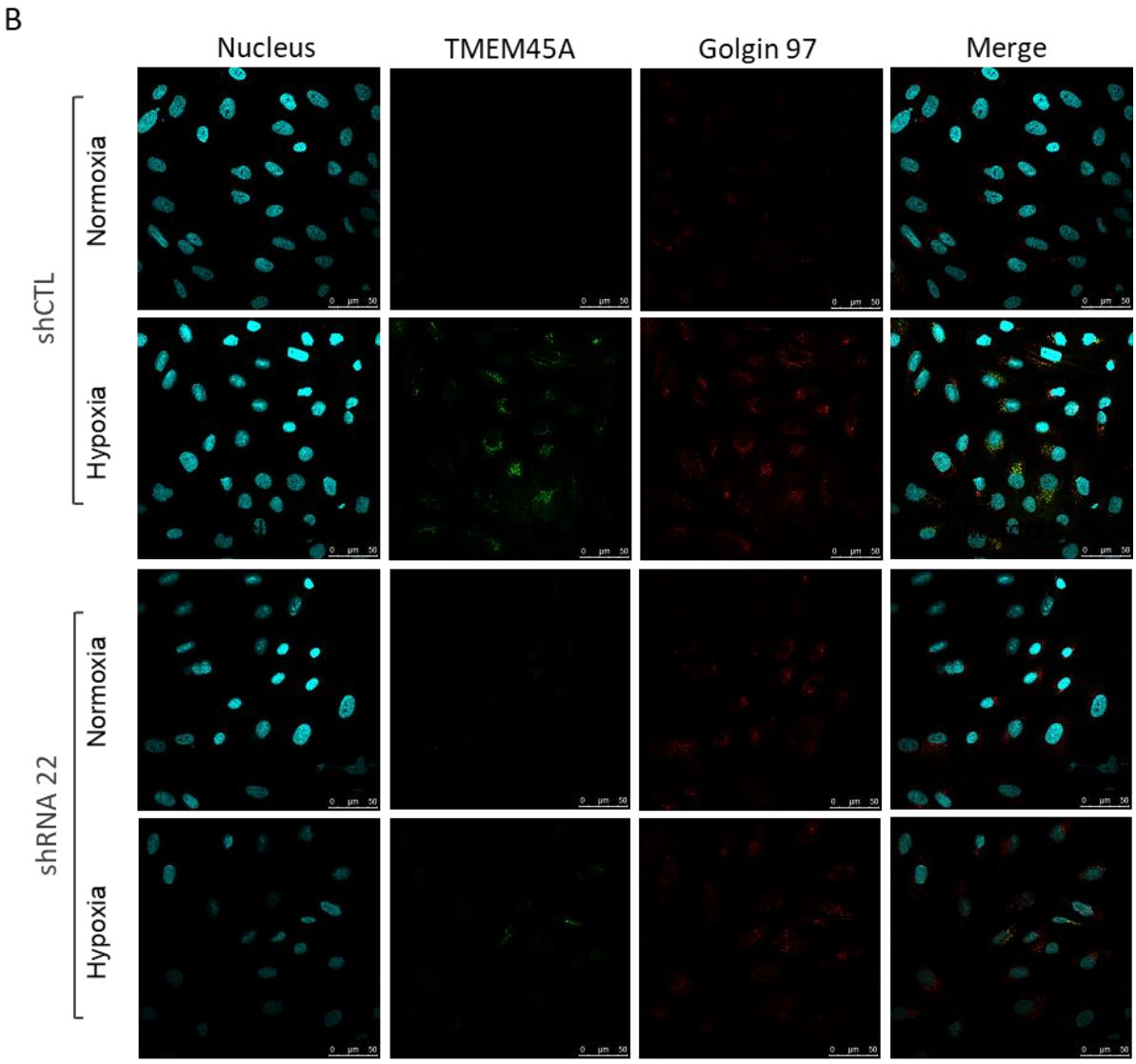
En parallèle aux cellules CAL27, les cellules SQD9 ont également été invalidées pour TMEM45A. Dans un premier temps, nous avons testé la sensibilité des cellules à la puromycine. Les cellules SQD9 ont été exposées à différentes concentrations de puromycine durant 24h et 48h puis la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Une exposition à la puromycine entraine une forte diminution de la viabilité cellulaire, mais cette diminution est moins importante que pour les cellules CAL27. En effet, il faut attendre 48h avant d'avoir une diminution totale de la viabilité cellulaire. Nous avons choisi la plus faible concentration entrainant le plus haut taux de mortalité en 24h soit 4 µg/mL (figure R10A). Ces résultats soulignent à nouveau que la lignée CAL27 est plus sensible que la lignée SQD9 face aux agents cytotoxiques.

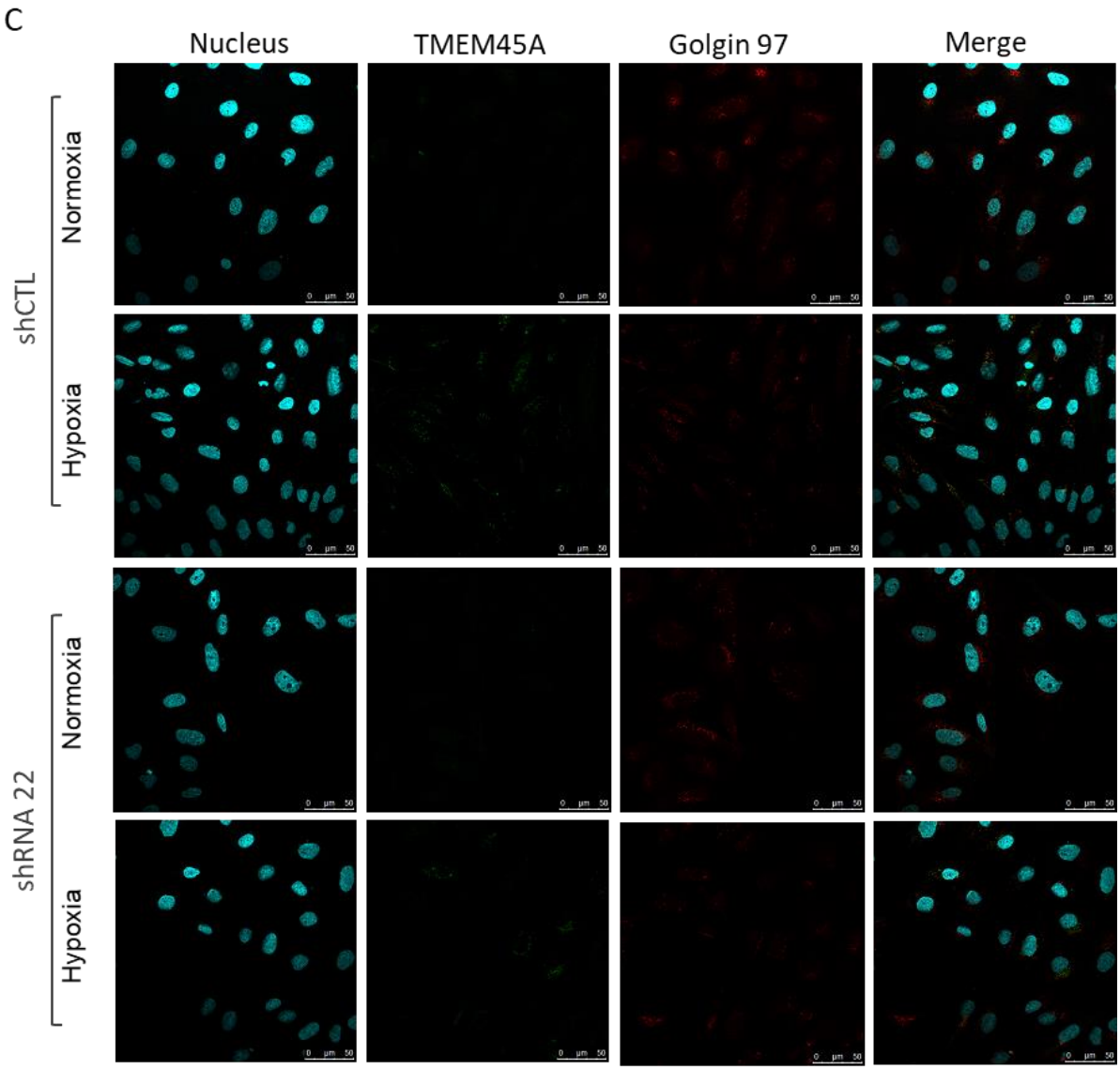
Le niveau d'expression de TMEM45A a été étudié suite à son invalidation par siARN et shARN (shARN 22 et shARN 92). Le niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A est fortement diminué en condition de normoxie et d'hypoxie dans les cellules invalidées pour TMEM45A en comparaison aux cellules contrôles que ce soit après transfection avec des siARN ou transduction avec le shARN 22 (figures R10B et R10C). L'invalidation de TMEM45A par le shARN 22 a été confirmée au niveau protéique par marquage en immunofluorescence. Dans les cellules contrôles, en condition d'hypoxie, la protéine TMEM45A est surexprimée et localisée au niveau du trans-Golgi. Dans les cellules invalidées, le niveau d'expression de la protéine TMEM45A est diminué que ce soit en condition de normoxie ou d'hypoxie (figure R11). L'ensemble de ces résultats montrent l'efficacité de l'invalidation de TMEM45A dans les cellules SQD9. De plus, cette invalidation par shARN est stable dans le temps.

4.3 Cellules RCC4 plus pVHL

L'étude du rôle de TMEM45A dans la chimiosensibilité des cellules RCC4 plus pVHL a uniquement été réalisée par une invalidation par shARN. La première étape consistait a évaluer l'efficacité de l'invalidation de TMEM45A par le shARN 22. Pour cela les cellules ont été transduites par les particules lentivirales à une MOI de 10. A la vue de la sensibilité des cellules RCC4 plus pVHL au cisplatine, après transduction, les cellules ont été sélectionnées par la puromycine à 4 µg/mL comme les cellules SQD9. Les cellules ont ensuite été incubées en conditions de normoxie et d'hypoxie durant 48h. L'abondance relative de l'ARNm de TMEM45A a été quantifiée par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Une diminution de l'expression de l'ARNm de TMEM45A a été observée dans les cellules invalidées en comparaison aux cellules contrôles en conditions de normoxie et d'hypoxie (figure R12A). Cependant, au fil des passages post transduction l'efficacité de l'invalidation semble


A
Nucleus
TMEM45A
Golgin 97
Merge
shCTL
Normoxia
Hypoxia
shRNA 22
Normoxia
Hypoxia


B
Nucleus
TMEM45A
Golgin 97
Merge
shCTL
Normoxia
Hypoxia
shRNA 22
Normoxia
Hypoxia



<u>Figure R13</u> : Expression de la protéine TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL

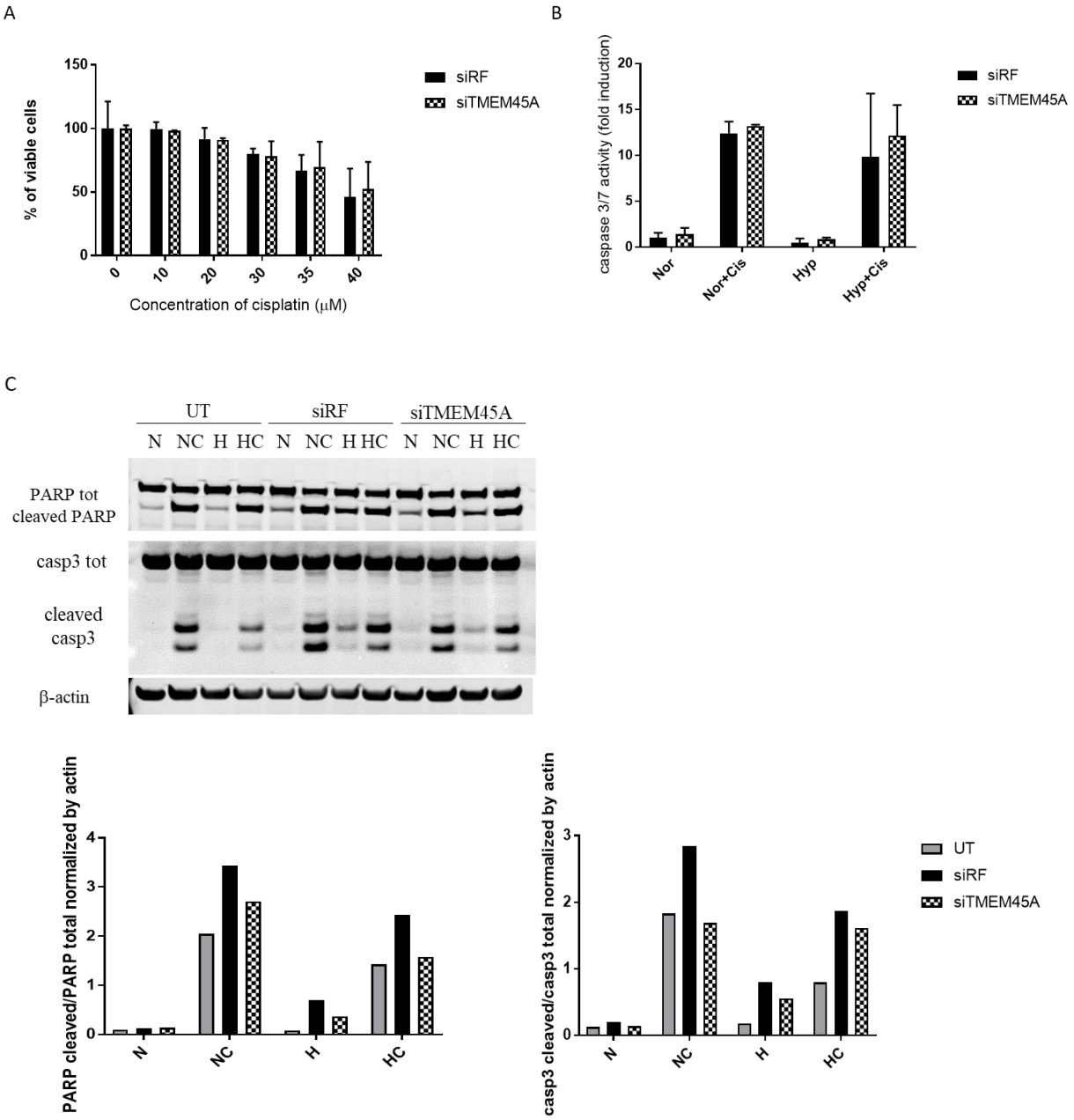
Les cellules RCC4 plus pVHL ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées durant 48h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis l'expression de la protéine TMEM45A (vert) et de la protéine Golgin 97 (rouge) a été analysée par immunofluorescence après passages post transduction précoces (A), passages post transduction intermédiaires (B) et passages post transduction tardifs (C). Les noyaux ont été marqués au Hoescht. Les images ont été prises avec un microscope confocal.

diminuer avec 65 % d'invalidation à des passages tardifs (supérieur à 12 passages) contre 90 % d'invalidation à des passages précoces (moins de 6 passages) (figure R12B).

Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique par marquage en immunofluorescence. En effet, l'invalidation de TMEM45A entraine une diminution du niveau d'expression de la protéine TMEM45A en condition de normoxie et d'hypoxie. A passage précoce, 11 % de la population de cellules montre une expression de la protéine TMEM45A malgré son invalidation. Ce pourcentage de cellules exprimant TMEM45A monte à 19% dans les passages intermédiaires (7 à 12 passages) et atteint même 24 % aux passages post transduction tardifs (figure R13). Cette expérience permet également de valider dans ce modèle l'induction de l'expression de TMEM45A en hypoxie et de confirmer sa localisation au trans-Golgi grâce à une colocalisation avec la protéine golgin-97, marqueur du réseau trans-Golgien (figure R13). Ces résultats indiquent une invalidation efficace mais pas totale de TMEM45A dans les cellules transduites avec le shARN 22 mais également une perte de l'invalidation au cours du temps. Ainsi pour la suite de l'étude, les expériences ont été réalisées uniquement à des passages post-transduction précoces.

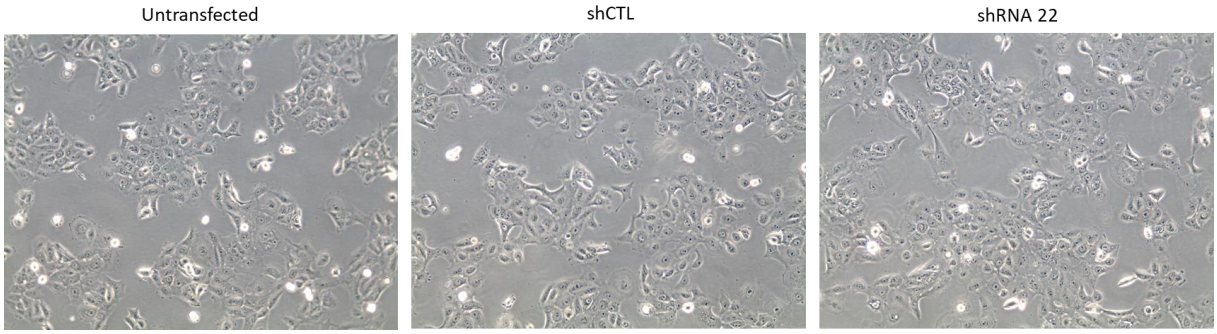
Conclusion

Les résultats présentés ci-dessus permettent de valider les conditions expérimentales pour l'invalidation de l'expression de TMEM45A. En effet, que ce soit par la technique de siARN ou la technique de shARN, le niveau d'expression de TMEM45A est diminué que ce soit en conditions de normoxie ou d'hypoxie. Dans le cas de l'invalidation par shARN, l'invalidation semble être stable dans les cellules CAL27 et SQD9, ce qui n'est pas le cas des cellules RCC4 qui montrent en effet une perte de l'invalidation au cours du temps.



<u>Figure R14</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A par siARN sur la chimiosensibilité des cellules CAL27

Les cellules CAL27 ont été transfectées avec des siARN contrôles (siARN Risc Free = siRF) ou des siARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (siTMEM45A). (A) Après transfection, les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de cisplatine durant 16h en condition de normoxie et la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules incubées sans cisplatine. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=2). (B) Les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de 35 µM de cisplatine durant 16h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après lyse des cellules, l'activité des caspases a été quantifiée par la détection de la fluorescence émise par le clivage d'un substrat, le DEVD-AFC. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=2). (C) Les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de 35 µM de cisplatine durant 16h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis le clivage de PARP et caspase 3 a été analysé par western blot (n=1). Nor ou N : normoxie ; Nor+Cis ou NC : normoxie plus cisplatine ; Hyp ou H : hypoxie ; Hyp+Cis ou HC : hypoxie plus cisplatine.



<u>Figure R15</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A par shARN sur la morphologie des cellules CAL27

Les cellules CAL27 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, la morphologie des cellules a été analysée par microscopie optique à contraste de phase.

Chapitre 2 : Rôle de la protéine TMEM45A dans la sensibilité au cisplatine

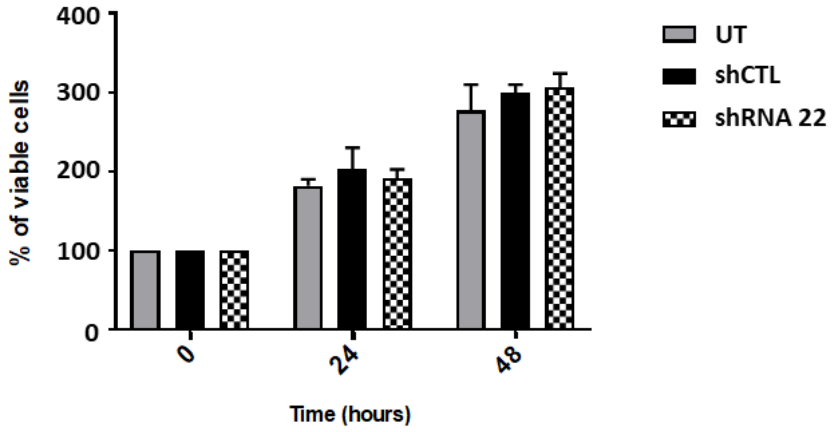
Le rôle de la protéine TMEM45A dans la sensibilité au cisplatine a été étudié dans les cellules Cal27, SQD9 et RCC4 plus pVHL.

1. Impact de l'invalidation de TMEM45A dans les cellules Cal27

La sensibilité au cisplatine a d'abord été analysée après invalidation de l'expression de TMEM45A par siARN. Après invalidation de TMEM45A, la sensibilité des cellules CAL27 a été étudiée par test MTT. Pour cela les cellules ont été exposées à différentes concentrations de cisplatine mais la sensibilité à l'agent chimiothérapeutique reste la même entre les cellules invalidées et les cellules contrôles (figure R14A). L'induction de l'apoptose par le cisplatine a également été investiguée par étude de l'activité des caspases et le clivage des deux effecteurs de la voie apoptotique, PARP et caspase 3. Les cellules CAL27 contrôles et invalidées pour TMEM45A ont été exposées à 30 µM de cisplatine durant 16h puis l'induction de l'apoptose a été étudié. Les résultats ne montrent aucune modification de l'activation des caspases en présence de cisplatine entre les cellules invalidées pour TMEM45A et les cellules contrôles (figure R14B). Dans le cas de l'analyse du clivage de PARP et caspase 3, les résultats montrent dans les cellules non transfectées un clivage des deux effecteurs en présence de cisplatine, signe de mort cellulaire par apoptose, clivage qui diminue en condition d'hypoxie, signe de protection contre la mort cellulaire induite par le cisplatine. Cependant, dans le cas des cellules transfectées contrôles, le clivage de PARP et caspase 3 en présence de cisplatine augmente en comparaison aux cellules non transfectées (figure R14C). Ces résultats signifient que la transfection elle-même sensibilise les cellules CAL27 au cisplatine. Ainsi nous ne pouvons pas conclure quant à l'effet de l'invalidation de TMEM45A par siARN sur le clivage des deux effecteurs de la voie apoptotique en présence de cisplatine.

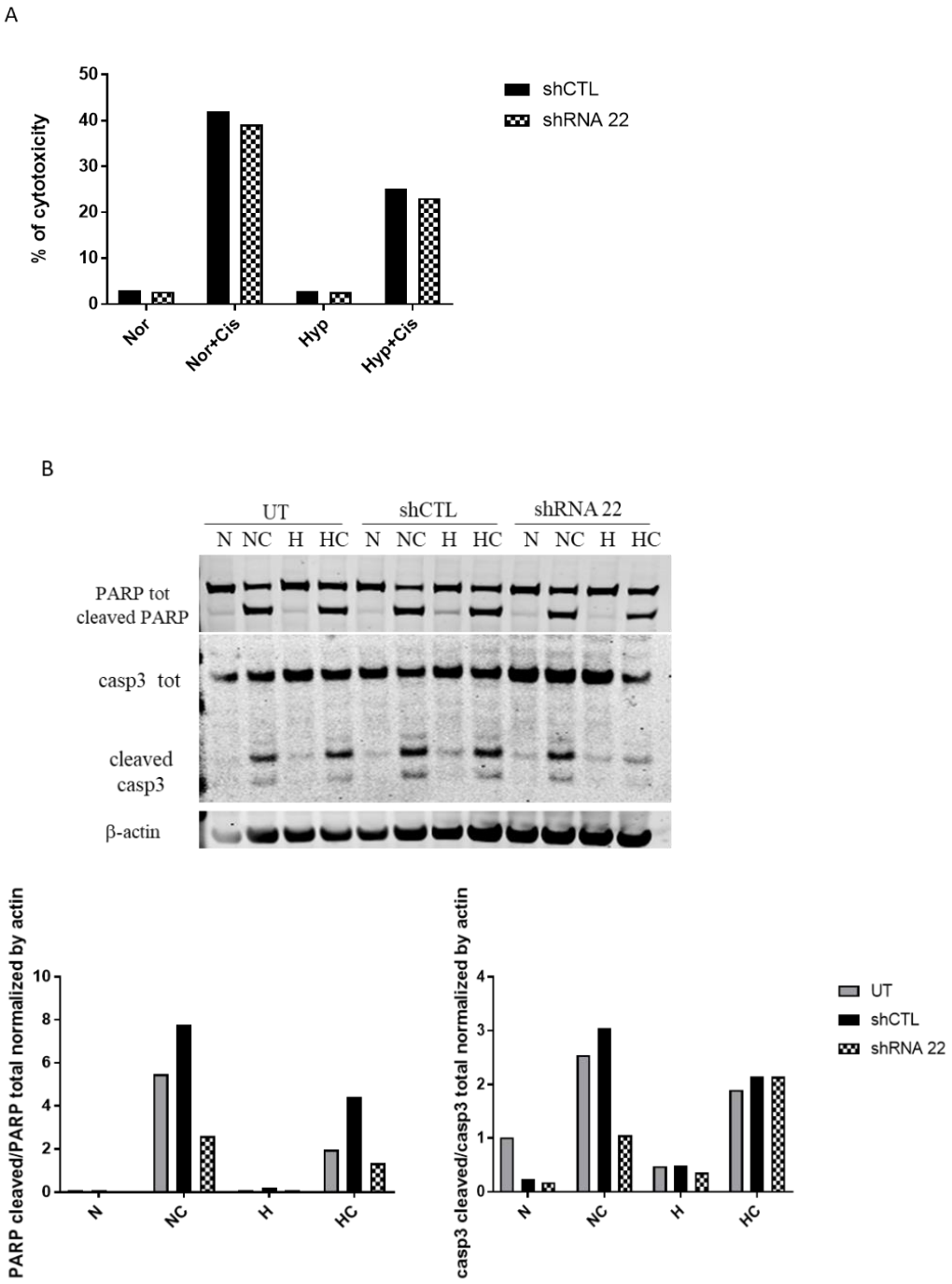
L'invalidation de TMEM45A par siARN étant transitoire, elle ne nous permet pas d'observer des altérations phénotypiques à long terme. De plus, l'efficacité de l'invalidation de l'expression de TMEM45A par siARN est moindre qu'avec une invalidation par shARN, il est possible alors d'observer des effets de l'invalidation de TMEM45A par shARN qui ne sont pas retrouvés avec une invalidation par siARN. Il est donc important d'utiliser ces deux techniques d'invalidation qui n'apportent pas les mêmes informations.

Suite à l'invalidation de l'expression de TMEM45A par shARN, nous avons dans un premier temps observé la morphologie des cellules invalidées en comparaison aux cellules contrôles. Aucune modification de la morphologie n'a été observée dans les cellules CAL27 invalidées pour TMEM45A (figure R15).



<u>Figure R16</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A par shARN sur la prolifération des cellules CAL27

Les cellules CAL27 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules CAL27 ont été incubées 24h et 48h en condition de normoxie et la viabilité cellulaire a été mesurée par test MTT. La prolifération a ensuite été calculée en prenant la valeur temps 0 comme valeur de référence (n=2).



<u>Figure R17</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A par shARN sur la chimiosensibilité des cellules CAL27

Les cellules CAL27 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). (A) Après transduction, les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de 35 µM de cisplatine durant 40h et la cytotoxicité du cisplatine a été mesurée par test LDH (n=1). (B) Les cellules CAL27 ont été incubées en absence ou en présence de 35 µM de cisplatine durant 16h et le clivage de PARP et caspase 3 a été analysé par western blot (n=1). Nor ou N : normoxie ; Nor+Cis ou NC : normoxie plus cisplatine ; Hyp ou H : hypoxie ; Hyp+Cis ou HC : hypoxie plus cisplatine.

La prolifération des cellules CAL27 contrôles et invalidées pour TMEM45A a été étudiée en suivant le nombre de cellules au cours du temps. En effet, après ensemencement, un premier test MTT est effectué et la valeur obtenue sert alors de référence (temps 0). Ainsi, le taux de prolifération après 24 et 48h a été calculé en fonction de la valeur de référence de chaque condition. Nous n'avons observé aucune modification du taux de prolifération des cellules invalidées en comparaison aux cellules contrôles (figure R16). De plus, les résultats indiquent que la transduction elle-même n'a pas d'impact sur la morphologie ou la prolifération des cellules puisqu'aucun changement n'est observé entre les cellules non transduites et les cellules transduites contrôles ou invalidées.

La sensibilité des cellules CAL27 après invalidation de l'expression de TMEM45A par shARN a été étudiée. Les cellules CAL27 ont été exposées à 30 µM de cisplatine durant 16h puis la cytotoxicité de la molécule a été mesurée par test LDH. L'invalidation de TMEM45A n'a aucun impact sur la cytotoxicité du cisplatine dans les cellules CAL27 et n'altère pas la protection conférée par l'hypoxie face au cisplatine (figure R17A). Dans les mêmes conditions, l'induction de l'apoptose a été étudiée via le clivage de PARP et caspase 3. Des résultats similaires aux expériences précédentes ont été observés. En effet, les cellules transduites contrôles montrent une sensibilité au cisplatine plus importante que dans les cellules non transduites (figure R17B). L'invalidation de TMEM45A ne semble pas modifier la sensibilité au cisplatine des cellules CAL27. De plus, la protection conférée par l'hypoxie face à la mort cellulaire induite par le cisplatine est toujours présente signifiant que TMEM45A n'est pas essentiel à cette protection dans le cas des cellules CAL27.

A la vue de ces résultats, nous n'avons pas continué l'étude de l'implication de TMEM45A dans la chimiosensibilité des cellules CAL27.

2. Article en soumission dans « International Journal of Cancer »

Nous avons ensuite, investigué le rôle de TMEM45A dans les lignées SQD9 et RCC4 plus pVHL. L'article intitulé "Dual role of TMEM45A to regulate sensitivity to cisplatin according to the cancer type" décrit l'effet de l'invalidation de TMEM45A sur la sensibilité au cisplatine des cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL mais également son impact sur les dommages à l'ADN induits par le cisplatine et l'activation de l'UPR. Le matériel et méthode qui s'y rapporte, les résultats et une discussion y sont présentés. A la suite de cet article, les résultats des expériences complémentaires et non inclus dans le manuscrit du papier sont présentés.

Characterization of cancer cell sensitivity to cisplatin by gene expression profiling in TMEM45A-invalidated cells

Kathleen SCHMIT[1], Jia-Wei CHEN[1], Sophie AYAMA-CANDEN[1], Maude FRANSOLET[1], Laure FINET[2], Catherine DEMAZY[1], Lionel D'HONDT[2], Carlos GRAUX[2], Carine MICHIELS[1]*

[1] URBC-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium

[2] Université Catholique de Louvain, CHU UCL Namur, Biobank, Yvoir, Belgium

Running title: Characterization of cancer cell sensitivity to cisplatin in TMEM45A-invalidated cells

* Correspondence: Carine Michiels, URBC-NARILIS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 NAMUR Belgium Email: carine.michiels@unamur.be

Keywords: TMEM45A, RNAseq, cisplatin, DNA repair, UPR

Novelty and Impact: TMEM45A is up-regulated in head and neck and renal cancer. This protein plays a dual role in cisplatin sensitivity in normoxic and hypoxic conditions depending of the cancer type and its invalidation impacts DNA damage repair and the activation of UPR pathway. TMEM45A could be used as a biomarker of tumor aggressiveness and for patient responses to treatment.

Abstract

TMEM45A is a transmembrane protein involved in tumor progression and cancer resistance to chemotherapeutic agents in hypoxic condition. Its overexpression is correlated to low patient survival in different cancer types. The mRNA expression of TMEM45A was assessed in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and renal cell carcinoma (RCC) biopsies. TMEM45A was up-regulated in patients diagnosed for head and neck or renal cancer. However, little is known about this protein. TMEM45A-invalidated cells displayed reduced proliferation as well as changes in the responses to cisplatin exposure. Through RNA sequencing analysis, several deregulated pathways were identified: TMEM45A regulates DNA damage repair, apoptosis and UPR pathway activation. This study demonstrated, for the first time, an anti- or a pro-apoptotic role of this protein depending on the cancer type and highlighted the possible use of TMEM45A as a biomarker for patient responses to treatment.

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) constitute two of the 10 most common cancers (1, 2). International Agency for Research on Cancer

estimates more than 350 000 new cases of HNSCC worldwide in 2018. HNSCC arises in the region of head and neck which comprises nasal cavity, paranasal sinuses, oral cavity, salivary glands, pharynx, and larynx. The only molecular classification of this cancer is based on the Human Papilloma Virus (HPV) infection status with 25% of oral cancer being HPV-positive (3). The current standard treatments for this disease are surgery, radiotherapy and chemotherapy. In latter case, the four most extensively used agents are methotrexate, cisplatin, 5-fluorouracil (5-FU) and bleomycin. For 40% of patients who present early stage of the disease, the single-modality treatment with surgery or radiotherapy is generally recommended despite the toxic effects on healthy tissues induced by radiotherapy. Over the years, significant advances have been made in combined modality therapies but the majority of patients who presented advanced disease relapse, develop metastases and only qualify for palliative treatment (4). These data show the importance of a better understanding of the disease, the need for discovery of new biomarkers and for the development of new therapeutic strategies.

Human RCC are classified in subtypes that have differences in genetics, biology and behavior. The most common subtype is clear cell RCC (ccRCC), which represents 75-80% of the group (5). ccRCC can be sporadic (more than 96%) or familial (less than 4%) but in both situations, the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene is the most frequently mutated gene (6, 7). ccRCC can be treated by surgical excision or with ablative therapies, but also with systemic therapies. Among the treatments, the most used drugs are the angiogenesis targeting agents including sorafenib, sunitinib and bevacizumab, which target vascular endothelial growth factor (VEGF) or its receptor (VEGFR). Despite all the therapeutic targeting agents discovered during the last decade, many patients are resistant to these treatments or acquire resistance over time (8, 9). Furthermore, due to the ability of the kidney to functionally compensate when partially damaged (10), most patients are diagnosed with advanced or metastatic RCC. New diagnostic markers and therapeutic strategies are thus highly needed.

Transmembrane protein family (TMEMs) is a family of proteins predicted to be components of various cell membranes, such as mitochondrial, endoplasmic reticulum and Golgi membranes. In many cancers, differential expression of TMEMs is observed and a large number of these proteins have been implicated in cancer development and in drug resistance (11).

TMEM45A is a transmembrane protein of 275 amino acids, predicted to have 5 or 7 transmembrane domains and which is up-regulated in hypoxic condition. This protein is highly expressed in the skin, is associated with trans-golgi apparatus and is correlated with epiderm keratinisation (12-14). TMEM45A has been proposed as a potential classifier of ccRCC (15) but was also associated with chemoresistance in human breast cancer cells (MDA-MB-231) and in human hepatoma cells (HepG2) in hypoxic condition (16). TMEM45A is involved in proliferation and invasion in human ovarian cancer cells and in human glioma cells (17, 18). In the cases of breast cancer and cervical lesions, a higher expression level of TMEM45A has been correlated with a lower patient overall survival suggesting that TMEM45A could be a potential biomarker for aggressiveness of breast cancer and cervical lesions (16, 19).

Owing to the possible role of TMEM45A in cancer resistance to different therapies and since the expression of this protein has been associated with tumor aggressiveness, we investigated the effect of TMEM45A invalidation in head and neck (SQD9) and renal cancer (RCC4 + pVHL) cells in normoxic or hypoxic conditions and explored the contribution of this protein in modulating the responses to treatment. The possible mechanisms were also studied. Our data support an implication of TMEM45A in the sensitivity of head and neck and renal cancer cells to cisplatin, hence the possible use of this protein as a prognostic marker in these cancer types.

Materiel and Methods

Patient study

After written informed consent of patients (Biobank CHU-UCL Namur, Belgium), healthy

tissues, which were histologically free from tumor and head and neck and renal cancer biopsies, were obtained from surgery. The Medical Ethical Committee of CHU-UCL Namur approved all described studies. After resection, the samples were stored at -80°C and mRNA were extracted as described in supplementary material.

Cell culture

Head and Neck squamous cell carcinoma cell line (SQD9) was obtained from Pierre Sonvaux laboratory, Woluwe, Belgium and maintained in culture in 75 cm^2 polystyrene flasks (Corning) in Minimum Essential Media (MEM) (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 % of heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific). Renal cell carcinoma cell line RCC4 stably transfected with pcDNA3-VHL (RCC4 plus pVHL) was purchased from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (Sigma-Aldrich) and maintained in culture in 75 cm^2 polystyrene flasks (Corning) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 2 mM of L-glutamine (Sigma-Aldrich), 10 % of Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific) and geneticin (0.5 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific). Cells were incubated under an atmosphere at 37°C containing 5 % CO_2.

Incubation and hypoxia incubation

Cisplatin (Sigma-Aldrich) was dissolved in NaCl 0.9% before each experiment then directly added in the culture medium without serum. All experiment was performed in serum-free CO_2-independent medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 500 µM of L-glutamine (Sigma- Aldrich), except for DNA damage repair experiment for which fresh culture medium with serum was added to the cells after cisplatin incubation. For hypoxia experiments, cells were incubated under 1 % O_2, whereas for normoxic conditions cells were incubated under normal atmosphere (20 % O_2).

Transfection and transduction

For transfection, SQD9 cells were seeded in 75 cm^2 polystyrene flasks (Corning) at a density of 3 000 000 cells per flask. TMEM45A knockdown was achieved using siGENOMESMART pool human TMEM45A (#M-021085-00 containing a mix of 4 siRNA: CAAUGUACUUCUGGAGCUA, GGGAAAUGCUGGACAUCUU, AAGCGAACCUGCUAUCUUG, UAAACAAGGUCACUGGAAU from Dharmacon). RISC-free control siRNA purchased from Dharmacon was used as a control for non-specific effects. Cells were transfected 24 hours under standard culture conditions with 50 nM siRNA using DharmaFect n°1 (Dharmacon) transfection reagent according to the manufacturer's instructions. Cells were then trypsinized and seeded at the appropriate density for further experiments.

For the transduction, cells were seeded in 25 cm^2 polystyrene flasks (Corning) at a density of 800 000 cells per flask. Cells were then transduced with shRNA lentiviral particles (Sigma): empty vector as a control for RCC4 cells and shRNA targeting the luciferase (CCGGCGCTGAGTACTTCGAAATGTCCTC GAGGACATTTCGAAGTACTCAGCGTTTTT) as negative control for SQD9 cells (shCTL) or shRNA targeting TMEM45A mRNA, shRNA22 (CCGGGAGTTCCTTGTTCGGAACAATCTC GAGATTGTTCCGAACAAGGAACTCTTTTT TG) and shRNA 92 (CCGGGATGACTCTAAGTGTACTGTTCTC GAGAACAGTACACTTAGAGTCATCTTTTT TG). The transduction was performed with a multiplicity of infection (MOI) of 5 in fresh medium with serum containing protamine sulfate (0.06mg/mL) (Sigma-Aldrich) for RCC4 cells. 24 hours after the transduction, the medium was replaced by fresh medium supplemented with puromycin (4 µg/mL) (Sigma-Aldrich) for 6 days of selection. After the selection, cells were seeded in 75 cm^2 polystyrene flasks (Corning) with medium without puromycin and used for further experiments.

RNA sequencing

After treatment with cisplatin, SQD9 cells were lysed with RLT Lysis Buffer (Qiagen) and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and the QIAcube (Qiagen). The experiment was performed for 4 independent experiments. The quality of the RNA samples was checked using the bioanalyser 2100 (Agilent). Samples were sent to Genomics core, KU Leuven where they were prepared for sequencing after the library construction. The single read sequencing was performed on Illumina's HiSeq 2500. Bioinformatics Consultancy Service analyzed the data in three steps: mapping, feature counting and statistical inference.

Caspase 3/7 activity

After incubation, the cells were lysed with a lysis buffer containing HEPES 20mM (Sigma-Aldrich), Tritriplex III 4 mM (Merck Millipore), CHAPS 0.2% (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate) (Sigma-Aldrich), sucrose 300 mM, DTT 1 M (Sigma-Aldrich) and MilliQ water. Then reaction buffer composed of PIPES (1,4-Piperazinediethanesulfonic acid**)** 40 mM (Sigma-Aldrich), NaCl 200 mM (Merck Millipore), Tritriplex III 2 mM (Merck Millipore), CHAPS 0.2% (Sigma-Aldrich), sucrose 300 mM, DTT 1 M (Sigma-Aldrich) was added to the lysis solution containing 15 µg of proteins. The fluorogenic substrate Ac-DEVD-AFC (BD Pharmingen) was used to measure caspase 3 and 7 activity. Fluorescence intensity was measured using a spectrophotometer at 400 nm for excitation and 505 nm for emission.

RT-qPCR

For patient biopsies, samples were lyzed in Qiazol reagent. After 5 minutes at room temperature, 200 µl of chloroforme were added and the samples were shacked vigorously for 2-3 minutes. After centrifugation at 12,000 x g for 15 minutes at 4°C, the upper aqueous phase was transferred to a new tube and the total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and the QIAcube (Qiagen). For cells samples, after the incubation, 600 µL of RLT Lysis Buffer (Qiagen) was added to lyse the cells. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and the QIAcube (Qiagen). mRNA contained in 2 µg of total RNA was reverse transcribed using first Strand cDNA Synthesis kit (Roche Life Science) following supplier's instructions. For the amplification cDNA was diluted at 1:100 in MilliQ water and added to the mix reaction containing 300 nM of forward and reverse primers (table 2) and SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) in a 5 to 1 ratio. qPCR was conducted on a StepOnePlus system (Applied Biosystems) following thermal cycling: 95°C for 5 min followed by 40 cycles at 95°C for 30 seconds and 60°C for 1 min. mRNA expression level was quantified using the threshold cycle method.

Western blot

After the incubation, cells were lysed in lysis buffer solution containing Trizma 40 mM (TRIS base) (Sigma-Aldrich), KCL 150 mM (Merck Millipore) and Tritriplex III 1 mM (Merck Millipore) with MilliQ water, Triton X100 1% (Sigma-Aldrich), phosphatase inhibitor cocktail (PIC, Roche) and phosphatase inhibitor buffer (PIB containing sodium orthovanadate (Na_3VO_3) (Sigma-Aldrich), 4-nitrophenylphosphate (PNPP) (Sigma-Aldrich), β-glycerophosphate (VWR) and sodium fluoride (NaF) (Merck)). Then 15 µg of proteins were mixed with MilliQ water and blue sample buffer composed of DTT (dithiothreitol) 5 % and LDS (lithium dodecyl sulfate) sample buffer 4x (Thermo Fisher Buffer) and heated up during 10 minutes to 70°C. Proteins were then separated on NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel or 3-8 % Tris Acetate Gel (Thermo Fisher Scientific). Afterwards, proteins were transferred on a PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane (Thermo Fisher Scientific). The membrane was incubated overnight at 4°C with the primary antibody (Table 1) in Odyssey Blocking buffer (Li-Cor Biosciences) with 0.1 % of Tween 20 (Bio-Rad Laboratories) and incubated with the secondary antibody during one hour in Odyssey Blocking buffer (Li-Cor) with 0.1 % of Tween 20 (Bio-Rad Laboratories). The membrane was scanned using the Odyssey Infrared Imager (Li-Cor Biosciences). The fluorescence was quantified

using the imaging software Odyssey V3.0 from the Odyssey Infrared Imager (Li-Cor Biosciences).

MTT

After incubation, MTT (Thiazol Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich) was diluted in PBS at 2.5 mg/mL and added to cell media for 2 hours at 37°C. Afterwards, cells were lysed with a lysis buffer composed of sodium dodecyl sulfate (SDS) 30 % (Merck Millipore) and N, N-dimethylformamide (Sigma- Aldrich) in a 2 to 1 ratio at pH 4.7 during an hour at 37°C. Finally, the optic density was read with a spectrophotometer at 570 nm.

LDH release

After the incubation, the supernatant of each well was collected in 1.5 mL microtubes labeled as "Pellet". 250 µL of PBS-Triton 4% were added in each well and plates were left at room temperature with a slight agitation during 10 minutes. The "Pellet" microtubes were centrifuged during 5 minutes at 2000 rpm at 4°C. The supernatant of the "Pellet" microtubes was then transferred into microtubes called "Supernatant" while the pellets were resuspended in 250 µL of PBS-Triton 4%. The cell lysate in the wells of the plates was collected in a third series of microtubes labeled as "Lysate". 100 µL of each sample were placed in a 96-well plate, except for the "Lysate" samples of which 5 µL were diluted in 95 µL of PBS-Triton 4 %. 100 µL of Cytotoxicity Detection Kit (Roche) were added in each well and after 15 minutes of reaction, the optic density was read with a spectrophotometer at 490 nm and 655 nm every 15 minutes until at least one value reached 2. The signal obtained at 655 nm was subtracted of the signal obtained at 490 nm and the percentage of cytotoxicity was then calculated as follows:

$$\% \ cytotoxicity = \frac{(Pellet-Blank)+((Supernatant-Blank)*4)}{(Pellet-Blank)+\big((Supernatant-Blank)*4\big)+((Lysate-Blank)*20)}$$

Immunofluorescence labelling

Cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates (Costar) at a density of 25 000 cells per well. After the incubation time, the medium was removed and cells were then fixed during 10 minutes with 4 % paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer saline (PBS) before being washed 3 times with PBS and permeabilized with PBS-triton 1 % for 5 minutes at room temperature. After permeabilization, cells were washed 3 times for 10 minutes with PBS-BSA 2 % (Bovine Serum Albumin) (Santa Cruz Biotechnology) then incubated with the primary antibody overnight at 4°C in the dark (Table 1). The next day, cells were washed 3 times with PBS-BSA 2 % before being incubated for 1 hour with the secondary antibody and Hoechst (Thermo Fisher Scientific H-21491) at 2 µg/mL at room temperature in the dark. Thereafter, cells were washed 3 times with PBS-BSA 2 % and once with PBS. The coverslips were finally mounted on slides in Mowiol mounting solution (Sigma) warmed at 57°C. Slides were observed by confocal microscopy (SP5, Leica).

Table 1: Antibodies used for immunofluorescence labeling and western blot.

Protein	Primary antibody	Secondary antibody
Immunofluorescence labelling		
TMEM45A	Anti-TMEM45A (Rabbit, Sigma HPA024082, 1/250)	Alexa 488 nm (Anti-rabbit, Thermo Fisher Scientific A-11008, 1/1000)
Golgin-97	Anti-Golgin-97 (Mouse, Thermo Fisher Scientific A-21270, 1/400)	Alexa 568 nm (Anti-mouse, Thermo Fisher Scientific, A-11004, 1/1000)
GM130	Anti-GM130 (Mouse, BD Biosciences 610823, 1/250)	Alexa 568 nm (Anti-mouse, Thermo Fisher Scientific, A-11004, 1/1000)
RAD51	Anti-RAD51 (Rabbit, Sigma HPA024012, 1/400	Alexa 488 nm (Anti-rabbit, Thermo Fisher Scientific A-11008, 1/1000)
H_2AX	Anti-Phospho Histone $H_2A.X$ S139 (Rabbit, Cell Signaling #2577S, 1/200)	Alexa 488 nm (Anti-rabbit, Thermo Fisher Scientific A-11008, 1/1000)
Western blot		
PARP	Anti-PARP (Mouse, BD Biosciences 6639GR, 1/2000)	IRDye 680RD (Anti-mouse, Li-Cor Biosciences 926-68070, 1/10000)
Caspase 3	Anti-Caspase 3 (Rabbit, Cell Signaling #9662S, 1/1000)	IRDye 800CW (Anti-rabbit, Li-Cor Biosciences 926-32211, 1/10000)
H_2AX	Anti-Phospho Histone $H_2A.X$ S139 (Rabbit, Cell Signaling #2577S, 1/1000)	IRDye 800CW (Anti-rabbit, Li-Cor Biosciences 926-32211, 1/10000)
ATM/ATR substrate	Anti-Phospho ATM/ATR substrate S*Q (Rabbit, Cell Signaling #9607, 1/1000)	IRDye 800CW (Anti-rabbit, Li-Cor Biosciences 926-32211, 1/10000)
EYA3	Anti-EYA3 (Rabbit, Abcam, ab129501, 1/1000)	IRDye 800CW (Anti-rabbit, Li-Cor Biosciences 926-32211, 1/10000)
IRE1α total	Anti-IRE1α (Rabbit, Novus bilogicals, NB100-2324, 1/1000)	IRDye 800CW (Anti-rabbit, Li-Cor Biosciences 926-32211, 1/10000)
phospho IRE1α	Anti-IRE1α Phospho S724 (Rabbit, Abcam, ab124945, 1/1000)	IRDye 800CW (Anti-rabbit, Li-Cor Biosciences 926-32211, 1/10000)
β-actin	Anti-β-Actin (Mouse, Sigma-Aldrich A5441, 1/10000)	IRDye 680RD (Anti-mouse, Li-Cor Biosciences 926-68070, 1/10000)

Table 2: Primers used for qPCR and PCR

Genes	Firm	Forward primer	Reverse primer
23 kDa	Integrated DNA Technologies	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG	TGAGCTGTTTCTTCTTCCGGTAGT
ATF6B	Integrated DNA Technologies	AGAGTCCCTGTCCCCTTCAG	ACTACAGGTTTGGGCTGCAG
CAIX	Integrated DNA Technologies	GAGGCCTGGCCGTGTTG	AACTGCTCATAGGCACTGTTTTCTT
Calreticulin	Integrated DNA Technologies	CACCAACGATGAGGCATACG	TTTGTTTCTCTGCTGCCTTTGTTAC
EYA3	Integrated DNA Technologies	AGCCATGGTTCATCTGTGGG	CAGTGCTTCCTTCCTCTGGG
HSP90B1	Integrated DNA Technologies	TCATCCAACTGACATTACTAGCC	ACAAATGGAGAAGATTCAGCCTC
MANF	Integrated DNA Technologies	ACCAGGACCTCAAAGACAGAG	CATTGATGATTTTGGTGGCTGC
PDIA6	Integrated DNA Technologies	GAAGATGTTTGGATGGTTGAGTTCT	TAGCATCCACAGCTGCCAGTT
TMEM45A	Integrated DNA Technologies	TTATGCAGTAACCATTGTCATCGTT	TGATTCTTGTTCTCGTTCAGCATT
XBP1	Integrated DNA Technologies	GATGGATGCCCTGGTTGCT	TGAAGAGTCAATACCGCCAGA

Statistical analysis

Prism software was used for the generation of all statistical analyses. Two-way ANOVA and multiple comparisons were used for all figures. $p<0.05$ was considered statistically significant. For consistency in these comparisons, the following identifies the significance values: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. All results are presented from 3 independent replicates.

All other experiments are described in supplementary material.

Results

TMEM45A expression in HNSCC and ccRCC

To explore the expression of TMEM45A in head and neck and renal cancer, we analyzed the expression level of TMEM45A in human samples of patients diagnosed for HNSCC or ccRCC. The mRNA level of TMEM45A was evaluated by RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction) in tumor samples and corresponding adjacent healthy tissues for each patient. TMEM45A transcript was upregulated in tumor tissues compared to healthy tissues in 86% (19/22) and 76% (19/25) of HNSCC samples and ccRCC samples respectively (supplementary figure 1A and B). TMEM45 is known to be up-regulated in hypoxic condition under the control of the transcription factor HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1) (12). Furthermore, in normoxic conditions, the stability of the subunit HIF1α is regulated by pVHL which is mutated and no functional in ccRCC conferring a state of pseudo-hypoxia and the stabilization of functional HIF1α (20). In order to confirm if the deregulation of TMEM45A expression in these samples was due to the stabilization of HIF1α, we analyzed the expression of a second HIF1 target gene, CAIX (Carbonic Anhydrase IX). All HNSCC samples which displayed TMEM45A overexpression also presented CAIX upregulation. For ccRCC, 9 samples out of 10 showed the same expression profile for TMEM45A and CAIX (supplementary figure 1C and D). These data revealed that TMEM45A is upregulated in a majority of patients with HNSCC and ccRCC and that this upregulation is probably under the control of HIF1.

Effect of TMEM45A invalidation on cell morphology and proliferation

The function of TMEM45A was studied in different cancer cell lines: SQD9 cells (larynx cancer) for HNSCC and RCC4 + pVHL cells for ccRCC. To that purpose, TMEM45A expression was invalidated using siRNA or shRNA strategies. A marked decrease in both TMEM45A mRNA and protein levels was observed in both cell lines (supplementary figure 2). TMEM45A invalidation was associated with the presence of large vesicles in SQD9 cells (figures 1A and 2B) whereas no change in morphology was observed for RCC4 + pVHL cells (figure 1C).

In parallel, a decrease of about 30% in the proliferation rate for both SQD9 and RCC4 + pVHL cells was observed in the invalidated cells compared to control cells (figure 1D and E). This decrease in proliferation is probably due to a delay in cell cycle progression since an accumulation of cells in S phase was detected (supplementary figure 3). These data indicate a role of TMEM45A in the regulation of SQD9 and RCC4 + pVHL cell proliferation.

Effect of TMEM45A invalidation on cell sensitivity to cisplatin

In order to investigate the role of TMEM45A in cancer cell chemoresistance, the different cancer cell lines were incubated in the presence of cisplatin. This chemotherapeutic drug induces DNA damage during cell replication, leading to cell death by apoptosis (21). The IC50 was reached after an incubation with 100 µM for 24h for SQD9 cells and with 20 µM for 48h for RCC4 + pVHL cells (supplementary figure 4). These conditions were thus used for the following experiments.

To study the potential implication of TMEM45A in chemosensitivity of SQD9 and RCC4 + pVHL cells, cisplatin-induced apoptosis was investigated in TMEM45A invalidated cells. In SQD9 cells, after TMEM45A knockdown using siRNA, the cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic or hypoxic conditions and the cleavage of two effectors of apoptosis, PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) and caspase 3 were analyzed by western blot. Figure 2A shows the cleavage of the two effectors, indicating the activation of apoptosis, which was much higher in the invalidated cells compared to control cells when incubated in the presence of cisplatin both in normoxic and hypoxic conditions. In order to validate the impact of TMEM45A invalidation on chemosensitivity, TMEM45A expression was also knockdown using shRNA. As for siRNA, the cleavage of the two effectors was more important in the invalidated cells compared to control cells in the presence of cisplatin (figure 2B) meaning that when TMEM45A was absent, SQD9 cells were

more sensitive to cisplatin. An increase in caspase 3 activity in the invalidated cells in the presence of cisplatin was also detected (figure 2C). Furthermore, the cytotoxicity of cisplatin was increased in cells invalidated for TMEM45A in the presence of the anticancer agent (data not shown). Similar results were obtained for an incubation of 48h with 20 µM of cisplatin (supplementary figure 5). Invalidation using another shRNA led to similar results (supplementary figure 6). All together these results showed that SQD9 cells were more sensitive to cisplatin in the absence of TMEM45A and indicated that this protein exerts a role in the resistance of SDQ9 cells to this anti-cancer drug.

To confirm the role of TMEM45A in drug resistance, we performed similar experiments in RCC4 + pVHL cells. TMEM45A was invalidated using shRNA and the cells were incubated with or without 20 µM of cisplatin for 48h. Surprisingly, TMEM45A invalidation led to a significant decrease in the cleavage of PARP and caspase 3 in the presence of cisplatin compared to control cells (figure 2D). To confirm this result, the cytotoxicity of cisplatin and cell viability were assessed. An increase in cytotoxicity were observed in invalidated cells (figures 2E). Furthermore, a decrease in cell viability were observed in invalidated cells compared to control cells (data not shown). RCC4 + pVHL cells were thus more resistant to cisplatin when TMEM45A was invalidated, meaning that in this cell type TMEM45A exerts a pro-apoptotic role whereas, in SQD9 cells, TMEM45A displayed an anti-apoptotic role.

Identification of deregulated genes and signaling-associated pathways in TMEM45A invalidated cells

In order to identify by which mechanisms TMEM45A can modulate the sensitivity of cancer cells to cisplatin, a transcriptome analysis by RNA sequencing was performed in SQD9 cells. 263 differentially expressed genes were identified in the absence of cisplatin and 469 differentially expressed genes were identified in the presence of cisplatin. Genes presenting the highest differences in expression are presented in figure 3A. Unsurprisingly, the most downregulated gene in cells incubated without cisplatin was TMEM45A, with a fold change of 0.2. Another interesting gene was POLDIP2 which has been implicated in DNA polymerase activation (22). Recently, this protein has been shown to be an oxygen-sensitive protein which supports metabolic adaptation in hypoxia in cancer cells (23, 24). Furthermore, POLDIP2 has been implicated in tumor growth and invasiveness in non-small cell lung cancer (25). All these data made of POLDIP2 a good candidate for further investigation but the difference observed in mRNA expression was not confirmed at protein level (data not shown).

Then, several putative deregulated pathways were identified by bioinformatic analysis using Babelomics analysis and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (supplementary figure 7). GSEA is based on the detection of coordinated differences in expression of sets of functionally related genes, allowing the identification of potential deregulated pathways. Then, heatmaps of differentially expressed genes for these pathways were generated using Heatmapper (26). We observed a potential deregulation of DNA damage and apoptosis (figure 3B), G2/M transition signaling pathway (figure 3C), and UPR (Unfolded Protein Response) activation (figure 3D). Cisplatin is a platinum-based anticancer agent known to induce DNA damage. But it has been shown that cisplatin can also induce apoptotic signaling through UPR activation, independently of DNA damage in enucleated cells (27). So, we decided to further investigated these two signaling pathways.

Effect of TMEM45A invalidation on DNA damage

To identify by which mechanism TMEM45A can play a pro or anti-apoptotic role according to the cancer type, we investigated the molecular impact of cisplatin on DNA damage response (28). The efficiency of this drug depends not only on its ability to induce DNA damage but also on the cell ability to detect and respond to these damages. Indeed, following DNA damage, cells may either repair the damage or if they cannot repair, the damage activate cell death by apoptosis. Histone H_2AX (H_2A Histone Family Member X) is one of the markers for DNA double strand break and allows, by its phosphorylation (then named γH_2AX), the detection of DNA damage and the

recruitment of DNA damage repair proteins (29). Thus, we investigated the detection and repair of DNA damage in SQD9 cells. The cells were incubated in the presence of cisplatin for different timings and PARP and γH_2AX was studied for apoptosis and DNA damage detection respectively. Figure 4A shows an increased level of γH_2AX after 1h, 2h and 4h of treatment but no difference was observed in the detection of these damages in invalidated cells compared to control cells. These results suggest that TMEM45A invalidation had no effect on the DNA damage induction or detection. Furthermore, for these incubation times, the cleavage of PARP observed was very low meaning that apoptosis was not yet activated.

Then we explored DNA damage during recovery to analyze repair ability. Cells were incubated in the presence of cisplatin then the drug was removed and cells were incubated in fresh medium. After 4h and 20h of recovery, γH_2AX reappeared and was significantly increased in the invalidated cells compared to control cells. The same results were observed for PARP cleavage meaning that SQD9 cells underwent apoptosis after 4h and 20h of recovery (figure 4B). It has to be noted that γH_2AX is also present at DNA break points when DNA is fragmented during apoptosis (30). So, a part of γH_2AX observed was probably due to apoptosis and not only to DNA damage induced by cisplatin. There are several possibilities to explain these results. First even if cisplatin was removed from the medium, the drug could be sequestrated inside the cell and could continue to produce DNA damage. No difference in DNA damage induction or detection was observed. Furthermore, we analyzed the phosphorylation of ATM substrate. ATM is recruited and activated by double strand break DNA and phosphorylates several targets such as H_2AX (31, 32). Figure 4C shows no difference in ATM/ATR substrate phosphorylation profile in the invalidated cells compared to control cells. These results confirm that TMEM45A invalidation did not impact the induction or the recognition of DNA damage. The second possibility is a decrease in the ability of the cancer cells to evade cisplatin-induced cell death for example via the regulation of proteins involved in the apoptotic pathway. Indeed, the deregulation of the expression of reparation proteins was observed in the RNA sequencing analysis (figure 3B). The third possibility is a defect in DNA damage repair mechanism in the invalidated cells leading to cell death. So, we explore the possible role of TMEM45A in the recruitment of DNA damage repair proteins. RNA sequencing data showed that EYA3 (Eyes Absent Homolog 3) was differentially expressed in the invalidated cells compared to control cells in the presence of cisplatin. EYA3 is known to interact with γH_2AX only under DNA damage conditions and the phosphatase activity of EYA3 may dephosphorylate γH_2AX on tyrosine 142 leading to DNA damage repair and cell survival (33). Contrarily to this, we observed a downregulation of EYA3 protein level when TMEM45A was silenced (figures 4D). Furthermore, the expression of EYA3 in head and neck cancer biopsies was assessed and the expression profiles of TMEM45A and EYA3 were similar. Indeed, when TMEM45A was upregulated EYA3 was also overexpressed and the only patient who presented a downregulation of TMEM45A also displayed a downregulation of EYA3 (supplementary figure 1E). These results suggest that TMEM45A silencing had an impact on DNA damage repair through a lack of dephosphorylation of γH_2AX by EYA3, hence inducing a decrease in the recruitment of proteins involved in DNA damage repair.

To confirm the role of TMEM45A in DNA damage repair, the recruitment of one of the major proteins involved in DNA damage repair, RAD51 (RAD51 recombinase), was studied in SQD9 cells. γH_2AX and RAD51 immunofluorescence labelling showed a strong decrease in the recruitment of RAD51 to DNA damage when TMEM45A was invalidated. Furthermore, the absence of RAD51 recruitment was associated to the presence of γH_2AX labelling meaning that the DNA damage was still present and detected (figure 5). These results allow to conclude that the absence of TMEM45A increased the chemosensitivity of SQD9 cells by a decrease in RAD51-associated DNA damage repair. All these experiments were repeated in RCC4 + pVHL cells. However, the results did not evidence a

possible modulation of DNA damage induction or repair upon TMEM45A invalidation (data not shown).

Effect of TMEM45A invalidation on UPR activation in SQD9 cells

The transcriptome analysis also revealed a potential deregulation of the Unfolded Protein Response (UPR) (supplementary figure 7, figure 3D). Based on the knowledge that TMEM45A is localized to the trans-Golgi apparatus, that cisplatin can induce cell death through an activation of the UPR pathway and that the protein modification pathway appears to be altered in TMEM45A-invalidated cells (supplementary figure 8A), we decided to further investigate this pathway.

The role of UPR activation in regulating cisplatin induced-cell death is controversial. Indeed, a moderate UPR activation possesses an anti-apoptotic role that enhances cancer cell survival and impacts drug resistance (34, 35). However, severe UPR activation leads to apoptosis via the IRE1α (inositol-requiring enzyme-1) and PERK (PRKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase) pathway activation (36). To study the effect of TMEM45A invalidation on UPR activation, both cell lines were incubated with 20 µM of cisplatin for 48h, these conditions were chosen as, at earlier time points, no UPR activation could be detected (data not shown).

We first validated RNA sequencing results using RT-qPCR. For SQD9 cells, we confirmed the increase in the expression of MANF (Mesencephalic Astrocyte Derived Neurotrophic Factor), PDIA6 (Protein Disulfide Isomerase-Associated 6) and HSP90B1 (Heat Shock Protein 90 kDa Beta Member 1). ATF6B (Activating Transcription Factor 6 Beta) and Calr (Calreticulin) also showed the same tendency, but the statistical significance was not reached (figures 6A).

Then, we analyzed the activation of the UPR pathway by cisplatin and more particularly IRE1 activation. It has to be noted that we did not succeed in detecting a band corresponding to the phosphorylated protein in SQD9 cells (data not shown). So, IRE1α activation was analyzed through its unconventional RNA splicing activity of XBP1 (X-box binding protein 1) allowing it to become translated into a functional transcription factor (37). An increase in XBP1 splicing in the presence of cisplatin was observed, confirming the activation of the UPR pathway. More importantly, we observed a significant increase in XBP1 splicing in SQD9 cells invalidated for TMEM45A (figure 6B). These results suggest that TMEM45A invalidation led to a deregulation of ER homeostasis and to an activation of the UPR pathway. When the invalidated cells are incubated in the presence of cisplatin, this basal activation of the UPR pathway become more severe leading to cell death by apoptosis.

Effect of TMEM45A invalidation on UPR activation in RCC4 cells

In order to investigate if TMEM45A induced a basal activation of UPR signaling pathway in RCC4 + pVHL cells, we studied the mRNA expression level of MANF, PDIA6, HSP90B1, ATF6B and Calr using RT-qPCR. Contrary to SQD9 cells, no change of the expression of these genes was observed in RCC4 + pVHL cells (figures 6C).

Then, we analyzed the activation of the UPR pathway through the RNA splicing of XBP1. We observed XBP1 splicing in the presence of cisplatin, confirming the activation of the UPR pathway by the chemotherapeutic agent but this splicing was decreased in RCC4 + pVHL cells silenced for TMEM45A (figure 6D). These results suggest that TMEM45A invalidation did not induce basal activation of UPR pathway and that the silencing of this protein in RCC4 + pVHL cells decreased the cisplatin-induced UPR activation leading to chemoresistance. This study underlined the complex differential responses upon TMEM45A invalidation according to the cancer cell type.

Discussion

In this study, we demonstrated that TMEM45A invalidation impacted several functions in SQD9 and RCC4 + pVHL cells. Very little is known about this protein and our data may help to identify physiological functions as well as its implication in cancer responses to treatment. Our

data validated TMEM45A localization in trans Golgi apparatus. Furthermore, RNA sequencing analysis evidenced several deregulated pathways associated with Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. In parallel, in SDQ9 cells invalidated for TMEM45A, we observed the presence of some large vesicles probably resulting from the stress induced by the absence of TMEM45A in this cell type.

Among the deregulated pathways, our data indicated a deregulation of fatty acid biosynthesis (supplementary figure 7 and 8B) when TMEM45A was invalidated. PTGS2 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2), PTGS1 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1) and ALOX5 (Arachidonate 5-Lipoxygenase) gene products are localized in the endoplasmic reticulum. Metabolic adaptation of cancer cells is a complex process mainly characterized by a switch of mitochondrial oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis (38, 39). However, some studies highlight the role of fatty acid metabolism in tumor growth (40-42). This result means that the absence of TMEM45A in SQD9 cells may cause metabolic changes impacting cell proliferation. The absence of TMEM45A also led to a significant decrease in cell proliferation. This decrease may be explained by the deregulation of the expression of a list of genes implicated in G2/M transition pathway such as FANCA (Fanconi Anemia Complementation Group A) and ARPP19 (CAMP Regulated Phosphoprotein 19). FANCA is a DNA repair protein which plays a role in the cell cycle checkpoint and in the maintenance of chromosome stability (43). ARPP19 inactivates PP2A (Protein Phosphatase 2) in order to keep cyclin B1-CDK1 activity high during M phase (44, 45). The downregulation of these two genes may explain the delay observed in the invalidated cell proliferation.

RNA sequencing analysis suggested that TMEM45A silencing impacts SQD9 cell responses to the therapeutic agent though the deregulation of DNA damage responses and intrinsic or extrinsic apoptotic signaling pathways. Cisplatin is one of the most genotoxic agents. DNA damage induce the accumulation of p53 leading to the transcription of genes involved in cell cycle checkpoints and in the intrinsic and extrinsic death pathways (46). However, in SQD9 cells p53 is mutated. So, we investigated the DNA damage induction and repair through the γH_2AX expression level and the recruitment of RAD51 to DNA double strand break. In SQD9 cells, we observed a decreased in EYA3 expression that may lead to a lack of dephosphorylation of γH_2AX and a decrease in RAD51 recruitment to DNA damage. These data may explain the increased chemosensitivity observed in SQD9 cells. RAD51 is involved in DNA damage repair by homologous recombination but two other mechanisms exist to repair double-strand breaks, non-homologous end joining and microhomology-mediated and joining. Thus, it will be interesting to study actors of these mechanisms in our experimental models. Indeed, in RCC4 + pVHL cells, the lack of DNA damage repair by homologous recombination might be compensated by another mechanism.

In addition, our results showed an alteration of the protein modification pathway and the UPR activation pathway indicating that TMEM45A may be involved in post-translation protein modification and cellular trafficking. Indeed, the deregulation of ICMT (Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase) and GALNT2 (Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 2) genes which are implicated in post-translational methylation and O-linked glycosylation and of INSIG1 (Insulin Induced Gene 1) which mediates protein feedback between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus supports this hypothesis. All these deregulations possibly lead to an accumulation of unfolded proteins, hence to basal activation of UPR pathway in the TMEM45A invalidated cells. However, under cisplatin exposure, the basal activation induced by TMEM45A invalidation could modify the cell response to the anticancer agent. Indeed, in the presence of cisplatin SQD9 cells showed a severe activation of UPR pathway that may lead to cell death whereas RCC4 + pVHL cells showed a moderate activation of UPR pathway that may confer resistance to cisplatin-induced cell death (33).

Conclusion

This study highlines for the first time the dual role of TMEM45A in drug sensitivity depending of the cancer type. Indeed, TMEM45A invalidation modulated cisplatin-activation of UPR pathway leading to the resistance of RCC4 + pVHL cells, whereas it increased SQD9 cells sensitivity to cisplatin through the deregulation of cell responses to cisplatin-induced DNA damage. All together our data emphasize the involvement of TMEM45A in tumor aggressiveness and suggest that TMEM45A might be a putative target to develop new chemosensitizing agents at least in some cancer types.

Acknowledgements

The authors thank Antoine Fattaccioli and Martine Van Steenbrugge for their help.

The authors also acknowledge the “Morphology-Imaging” platform of the UNamur. KS is financed by Televie grant (FNRS- National Funds for Scientific Research, Belgium).

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Bibliography

1. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17009.

2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012;62(1):10-29.

3. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(2):467-75.

4. Vermorken JB, Specenier P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. Ann Oncol. 2010;21 Suppl 7:vii252-61.

5. Cairns P. Renal cell carcinoma. Cancer Biomark. 2010;9(1-6):461-73.

6. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. Clin Cancer Res. 2008;14(15):4726-34.

7. Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. Nat Genet. 1994;7(1):85-90.

8. Rajandram R, Bennett NC, Morais C, Johnson DW, Gobe GC. Renal cell carcinoma: resistance to therapy, role of apoptosis, and the prognostic and therapeutic target potential of TRAF proteins. Med Hypotheses. 2012;78(2):330-6.

9. Rini BI, Atkins MB. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. Lancet Oncol. 2009;10(10):992-1000.

10. Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. Am J Physiol. 1985;249(3 Pt 2):F324-37.

11. Schmit K, Michiels C. TMEM Proteins in Cancer: A Review. Front Pharmacol. 2018;9:1345.

12. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. Nucleic Acids Res. 2009;37(14):4587-602.

13. Hayez A, Malaisse J, Roegiers E, Reynier M, Renard C, Haftek M, et al. High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization. Exp Dermatol. 2014;23(5):339-44.

14. Hayez A, Roegiers E, Malaisse J, Balau B, Sterpin C, Achouri Y, et al. TMEM45A Is Dispensable for Epidermal Morphogenesis, Keratinization and Barrier Formation. PLoS One. 2016;11(1):e0147069.

15. Wrzesinski T, Szelag M, Cieslikowski WA, Ida A, Giles R, Zodro E, et al. Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. BMC Cancer. 2015;15:518.

16. Flamant L, Roegiers E, Pierre M, Hayez A, Sterpin C, De Backer O, et al. TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. BMC Cancer. 2012;12:391.

17. Guo J, Chen L, Luo N, Yang W, Qu X, Cheng Z. Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells. Oncol Rep. 2015;33(6):3124-30.

18. Sun W, Qiu G, Zou Y, Cai Z, Wang P, Lin X, et al. Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(10):12657-67.

19. Manawapat-Klopfer A, Thomsen LT, Martus P, Munk C, Russ R, Gmuender H, et al. TMEM45A, SERPINB5 and p16INK4A transcript levels are predictive for development of high-grade cervical lesions. Am J Cancer Res. 2016;6(7):1524-36.

20. Schodel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, et al. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. Eur Urol. 2016;69(4):646-57.

21. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol. 2014;740:364-78.

22. Guilliam TA, Bailey LJ, Brissett NC, Doherty AJ. PolDIP2 interacts with human PrimPol and enhances its DNA polymerase activities. Nucleic Acids Res. 2016;44(7):3317-29.

23. Paredes F, Sheldon K, Lassegue B, Williams HC, Faidley EA, Benavides GA, et al. Poldip2 is an oxygen-sensitive protein that controls PDH and alphaKGDH lipoylation and activation to support metabolic adaptation in hypoxia and cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(8):1789-94.

24. Paredes F, Suster I, Martin AS. Poldip2 takes a central role in metabolic reprograming. Oncoscience. 2018;5(5-6):130-1.

25. Chen YC, Kuo CC, Chian CF, Tzao C, Chang SY, Shih YL, et al. Knockdown of POLDIP2 suppresses tumor growth and invasion capacity and is linked to unfavorable transformation ability and metastatic feature in non-small cell lung cancer. Exp Cell Res. 2018;368(1):42-9.

26. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic Acids Res. 2016;44(W1):W147-53.

27. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. J Biol Chem. 2003;278(11):9100-6.

28. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. J Nucleic Acids. 2010;2010.

29. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. Methods Mol Biol. 2012;920:613-26.

30. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. J Biol Chem. 2000;275(13):9390-5.

31. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. J Biol Chem. 2001;276(45):42462-7.

32. Marechal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(9).

33. Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. Nature. 2009;458(7238):591-6.

34. Notte A, Rebucci M, Fransolet M, Roegiers E, Genin M, Tellier C, et al. Taxol-induced unfolded protein response activation in breast cancer cells exposed to hypoxia: ATF4 activation regulates autophagy and inhibits apoptosis. Int J Biochem Cell Biol. 2015;62:1-14.

35. Xu Y, Wang C, Li Z. A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress. Mol Clin Oncol. 2014;2(1):3-7.

36. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. Int Rev Cell Mol Biol. 2013;301:215-90.

37. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell. 2001;107(7):881-91.

38. Asgari Y, Zabihinpour Z, Salehzadeh-Yazdi A, Schreiber F, Masoudi-Nejad A. Alterations in cancer cell metabolism: the Warburg effect and metabolic adaptation. Genomics. 2015;105(5-6):275-81.

39. Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. Oncogenesis. 2016;5:e190.

40. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV, Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. Cell Metab. 2013;18(2):153-61.

41. Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. Radiother Oncol. 2009;92(3):329-33.

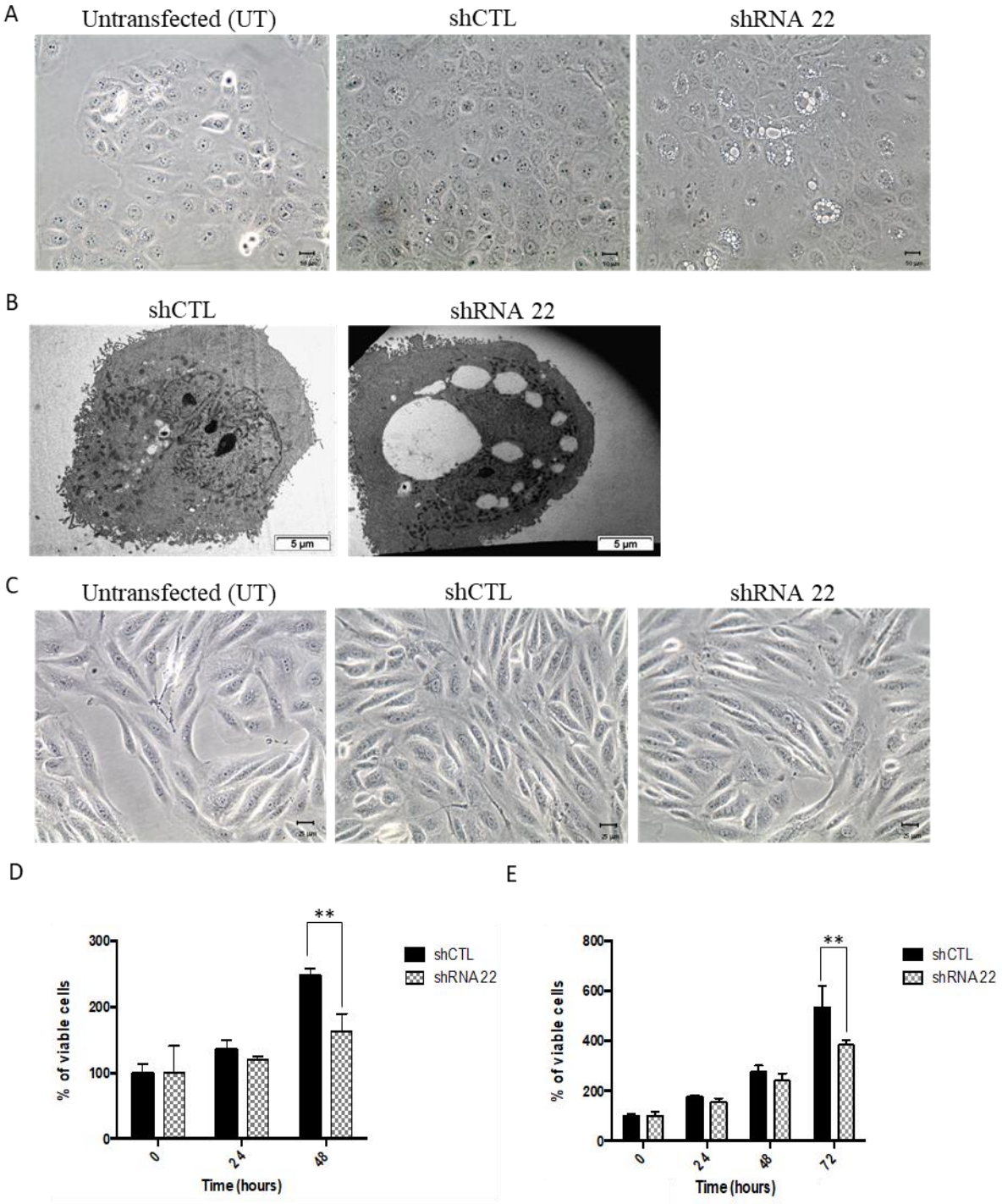
42. Corbet C, Feron O. Emerging roles of lipid metabolism in cancer progression. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2017;20(4):254-60.

43. Palovcak A, Liu W, Yuan F, Zhang Y. Maintenance of genome stability by Fanconi anemia proteins. Cell Biosci. 2017;7:8.

44. Gharbi-Ayachi A, Labbe JC, Burgess A, Vigneron S, Strub JM, Brioudes E, et al. The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. Science. 2010;330(6011):1673-7.

45. Ren D, Fisher LA, Zhao J, Wang L, Williams BC, Goldberg ML, et al. Cell cycle-dependent regulation of Greatwall kinase by protein phosphatase 1 and regulatory subunit 3B. J Biol Chem. 2017;292(24):10026-34.

46. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell. 1993;74(6):957-67.



<u>Figure 1</u>: Effect of TMEM45A invalidation on cell morphology and proliferation in SQD9 and RCC4 cells

SQD9 and RCC4 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL), shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22) or without shRNA (UT). SQD9 cells morphology was studied by optical microscopy (magnification x200) (**A**) and transmission electron microscopy **(B)**. RCC4 cells morphology was studied by optical microscopy (magnification x200) (**C**). After the infection, the cells were incubated in normoxic conditions for 24h and 48h for SQD9 cells (**D**) and for 24h, 48h and 72h for RCC4 cells (**E**), then the proliferation was assessed by MTT assay. The signal intensity at the seeding (time 0), was used to normalize the number of viable cells at different times. Results are expressed as mean ± SD (n=3). ** $p<0.01$

<u>Figure 2</u>: Effect of TMEM45A invalidation on the chemosensitivity to cisplatin in SQD9 and RCC4 cells

SQD9 cells were transfected with siRNA control (siRF= risc free) and siRNA targeting the mRNA of TMEM45A (siTMEM45A). SQD9 cells were incubated with or without 100 μM of cisplatin in normoxic (N) and hypoxic (H) conditions for 24h. (**A**) The apoptosis was studied by Western blot analyses of PARP and caspase 3 cleavage. Actin was used as the loading control. Results are expressed as mean ± SD (n=3). (**B** and **C**) SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). SQD9 cells were incubated with or without 100 μM of cisplatin in normoxic (N) and hypoxic (H) conditions for 24h. (**B**) After transduction and incubation, the cleavage of PARP and caspase 3 was assessed by western blot. Actin was used as the loading control. Results are expressed as mean ± SD (n=3). (**C**) After the incubation, caspase 3 and 7 activity was assessed by measuring free AFC released from the cleavage of caspase 3 and 7 specific substrate Ac-DEVD-AFC. Results are expressed as mean ± SD (n=5). (**D** and **E**) RCC4 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). RCC4 cells were incubated with or without 20 μM of cisplatin in normoxic (N) or hypoxic (H) conditions for 48h. (**D**) After transduction and incubation, the cleavage of PARP and caspase 3 was assessed by western blot. Actin was used as the loading control. Results are expressed as mean ± SD (n=3). (**E**) The cytotoxicity of cisplatin was assessed by LDH release. Results are expressed as mean ± SD (n=3). * $p<0.05$ ** $p<0.01$

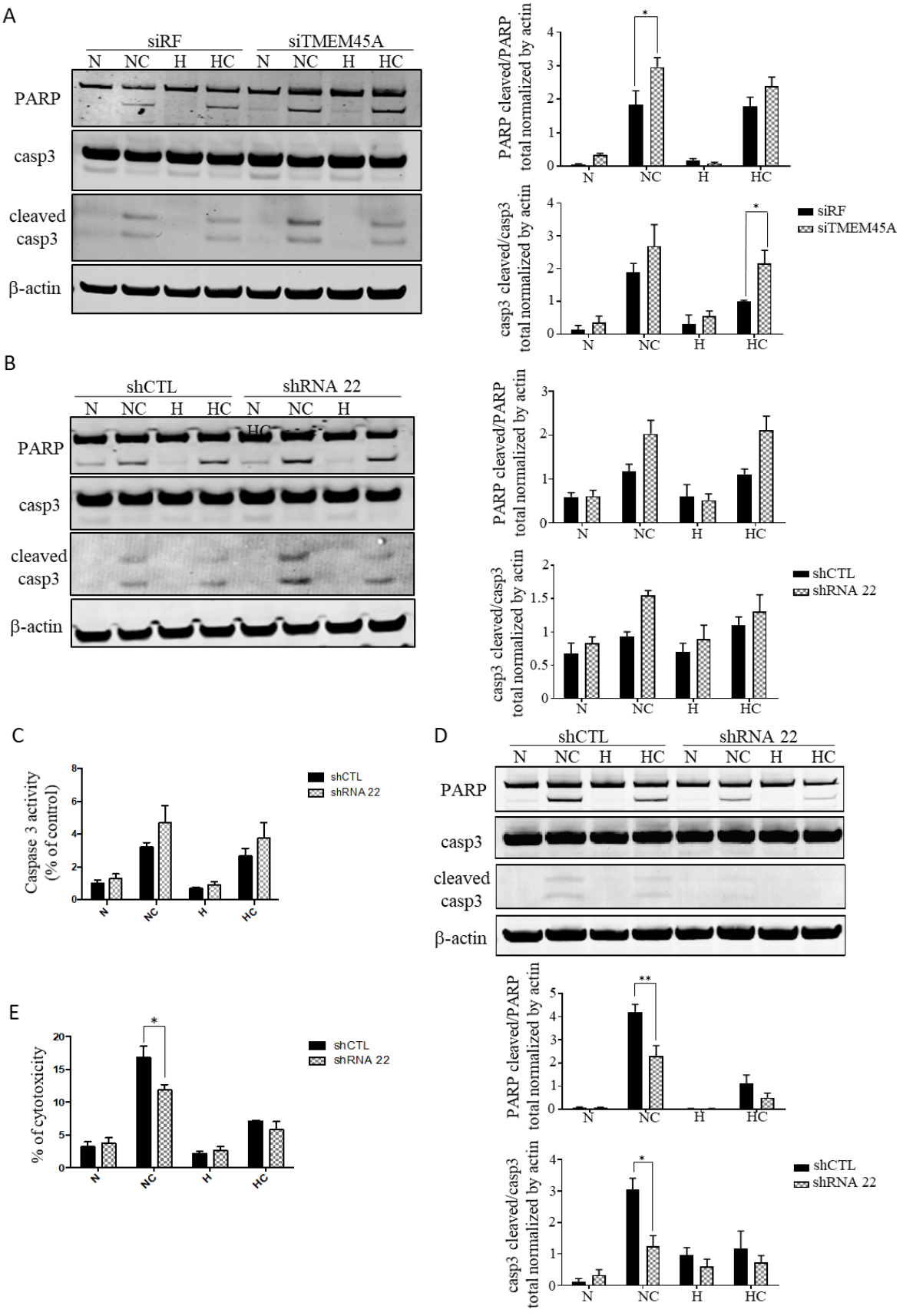

A
siRF
siTMEM45A
N NC H HC N NC H HC
PARP
casp3
cleaved casp3
β-actin
PARP cleaved/PARP total normalized by actin
casp3 cleaved/casp3 total normalized by actin
siRF
siTMEM45A
B
shCTL
shRNA 22
N NC H HC N NC H HC
PARP
casp3
cleaved casp3
β-actin
PARP cleaved/PARP total normalized by actin
casp3 cleaved/casp3 total normalized by actin
shCTL
shRNA 22
C
Caspase 3 activity (% of control)
shCTL
shRNA 22
N NC H HC
D
shCTL
shRNA 22
N NC H HC N NC H HC
PARP
casp3
cleaved casp3
β-actin
PARP cleaved/PARP total normalized by actin
casp3 cleaved/casp3 total normalized by actin
shCTL
shRNA 22
E
% of cytotoxicity
shCTL
shRNA 22
N NC H HC

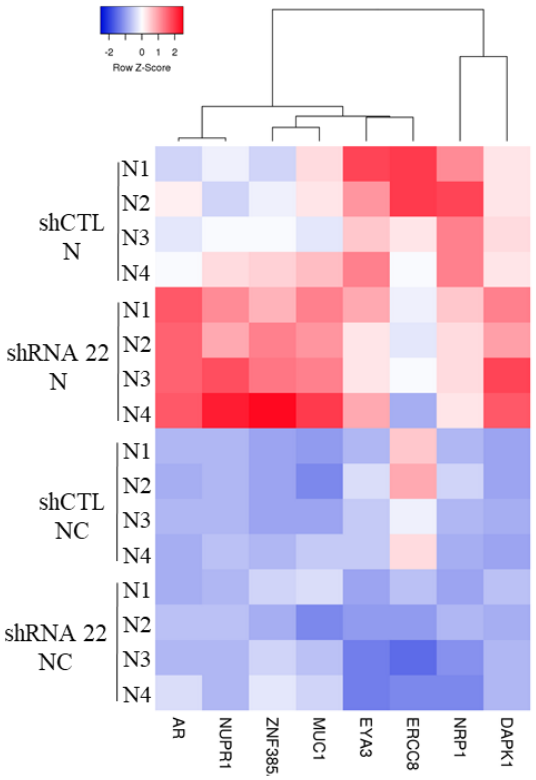
Figure 3: Effect of TMEM45A invalidation on genes expression and signaling-associated pathways

SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). The cells were incubated with or without 100 μM of cisplatin in normoxic (N) conditions for 24h and genes expression level was assessed by RNA sequencing. (**A**) Ten first genes differentially expressed in the invalidated cells in the absence or in the presence of cisplatin. (**B** to **D**) The transcriptome analysis was performed using Babelomics and GSEA after RNA sequencing. Heatmap of differentially expressed genes produced by using Heatmapper (http://www.heatmapper.ca) (26) showed a potential deregulation of (**B**) DNA damage and apoptosis, (**C**) G2/M transition and (**D**) UPR (Unfolded Protein Response) activation. Genes have been reordered by the method of average clustering. A dendrogram is shown for the clustering of genes. Genes with relatively high expression are marked in red, genes with relatively low expression are marked in blue.

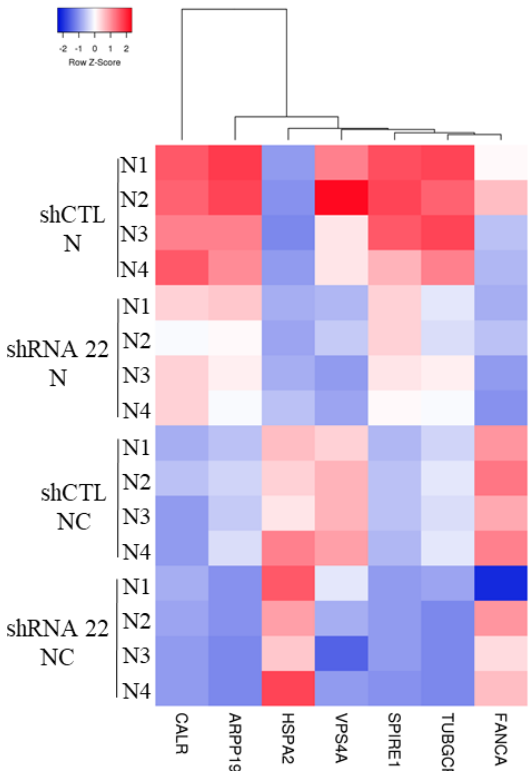
A

Without cisplatin		
id	**foldChange**	**pval**
TMEM45A	0.2	1.51E-043
GMFB	0.4	2.82E-017
SEPT11	2.6	4.09E-016
POLDIP2	0.4	4.24E-016
MIPEP	2.5	3.67E-013
TLR7	4.6	2.59E-012
DCTN5	2.3	3.00E-012
APOO	0.4	1.31E-011
NEDD4L	0.5	2.60E-011
TSPAN33	3.9	2.72E-011
With cisplatin		
id	**foldChange**	**pval**
ACTG1	4.7	2.45E-52
NAP1L1	4.2	8.48E-45
ELOVL5	0.2	4.89E-43
PSMB5	4.2	7.07E-43
POLDIP2	0.3	3.63E-40
TMEM45A	0.1	2.59E-35
GMFB	0.3	3.69E-35
SEPT11	3.3	1.20E-30
FAM57A	4.3	8.56E-30
SLC1A4	5.3	1.32E-28

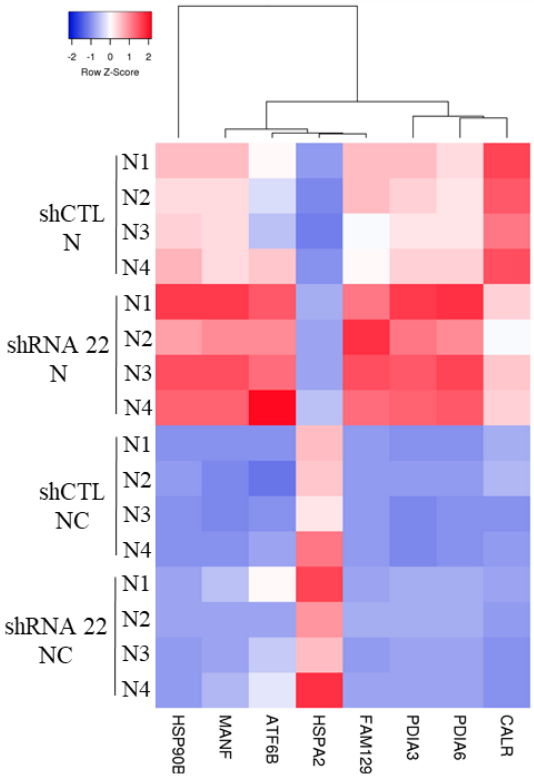
B



C

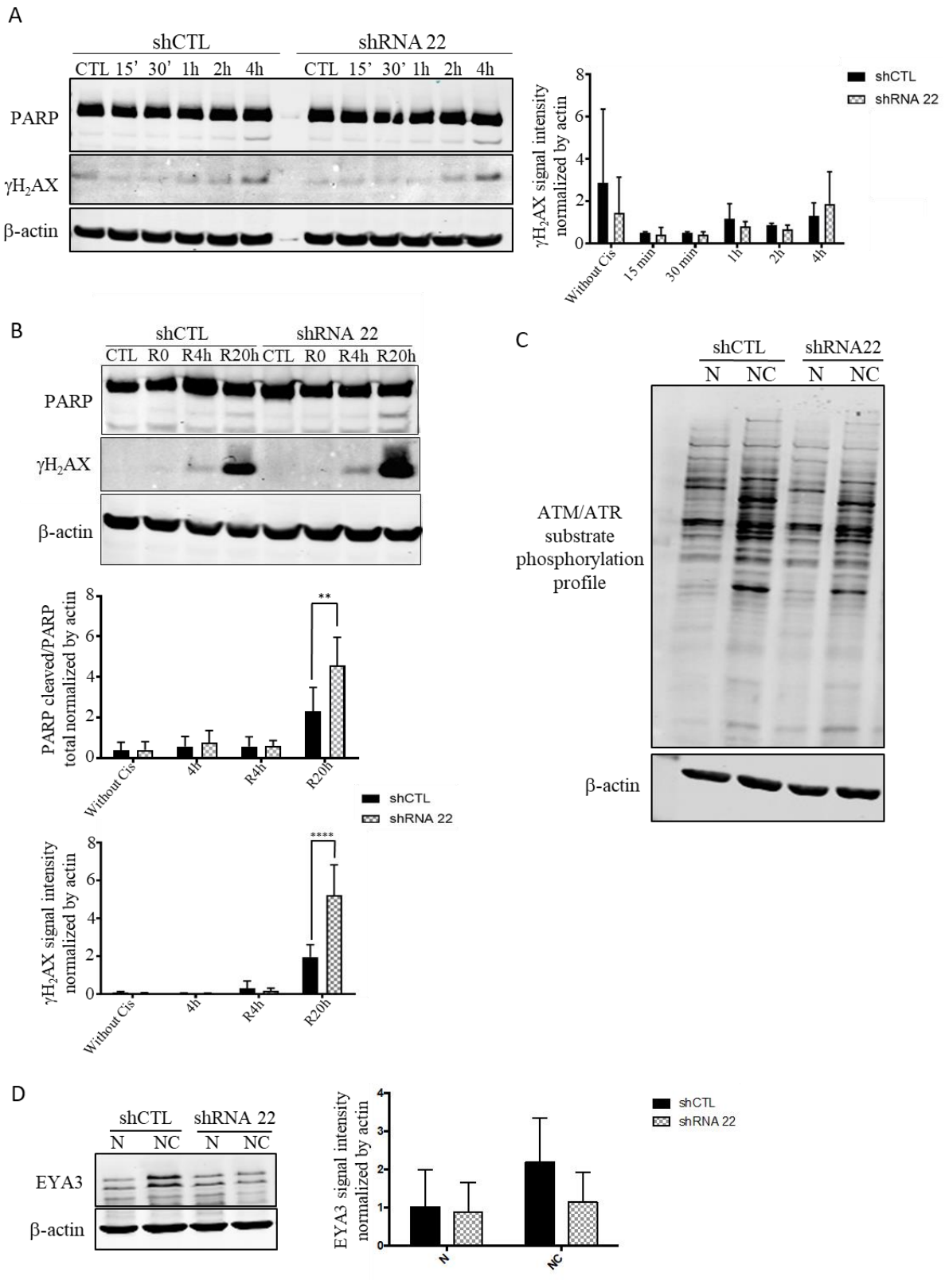


D



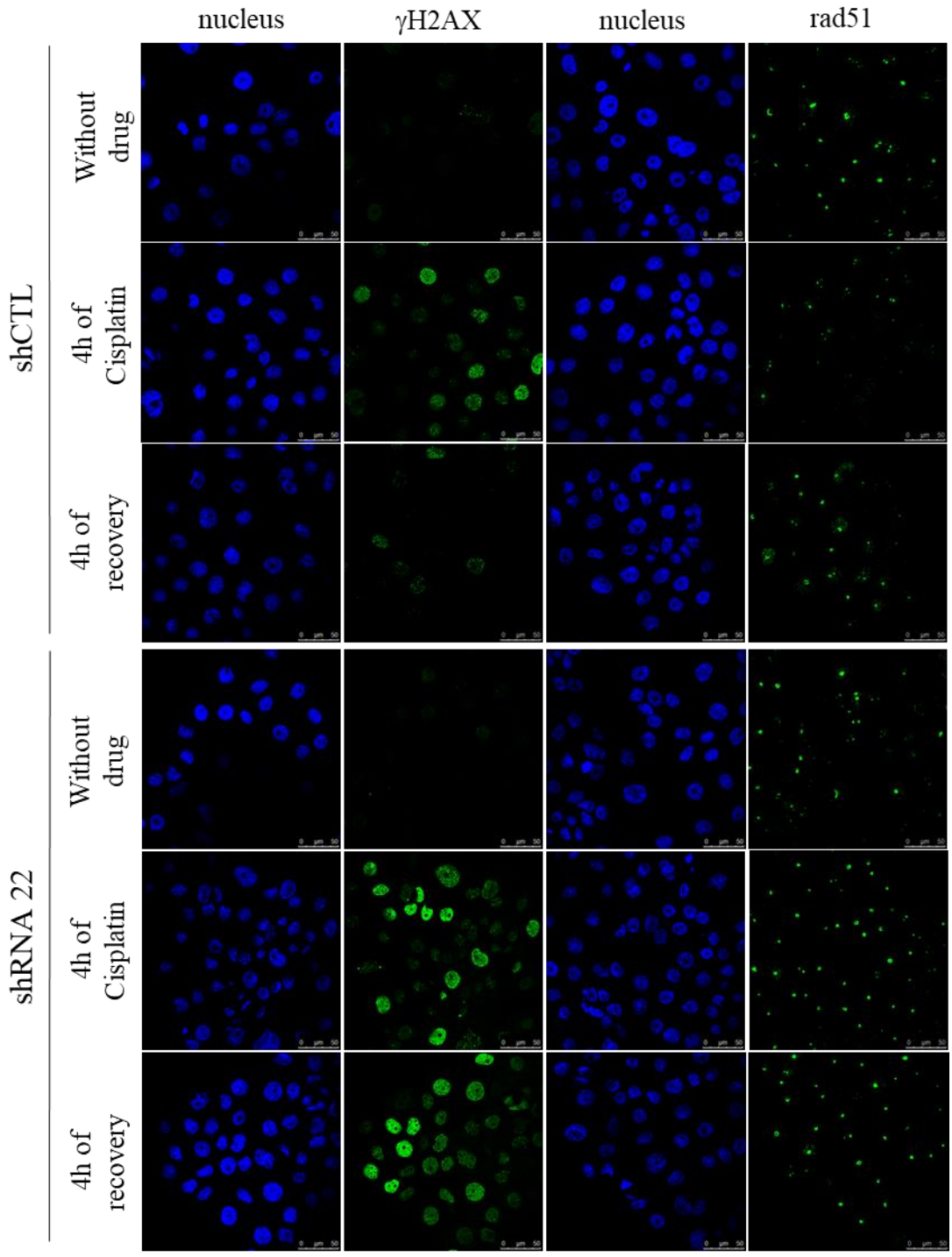
<u>Figure 4</u>: Effect of TMEM45A invalidation on DNA damage induction and repair

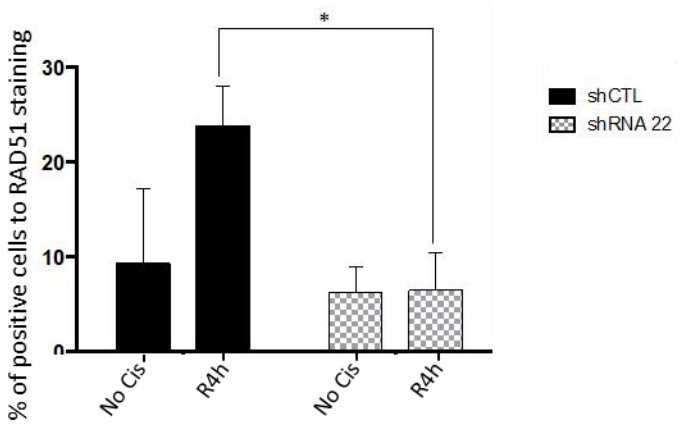
SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). (**A**) SQD9 cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic conditions for 15 min, 30 min, 1h, 2h and 4h. After the incubation, proteins were extracted and PARP cleavage and γH_2AX protein level were assessed by western blot. Actin was used as the loading control. Results are expressed as mean ± SD (n=3). (**B**) SQD9 cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic conditions for 4h then fresh medium without cisplatin was added to the cells for 4h or 20h. After the incubation, proteins were extracted and PARP cleavage and γH_2AX protein level were assessed by western blot. Actin was used as the loading control. Results are expressed as mean ± SD (n=3). (**C** and **D**) SQD9 cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic conditions for 24h. (**C**) ATM/ATR substrate phosphorylation profile was assessed by western blot. Actin was used as loading control (n=3). (**D**) EYA3 protein expression level was studied by western blot. Actin was used as loading control. Results are expressed as mean ± SD (n=3). ** $p<0.01$ **** $p< 0.0001$

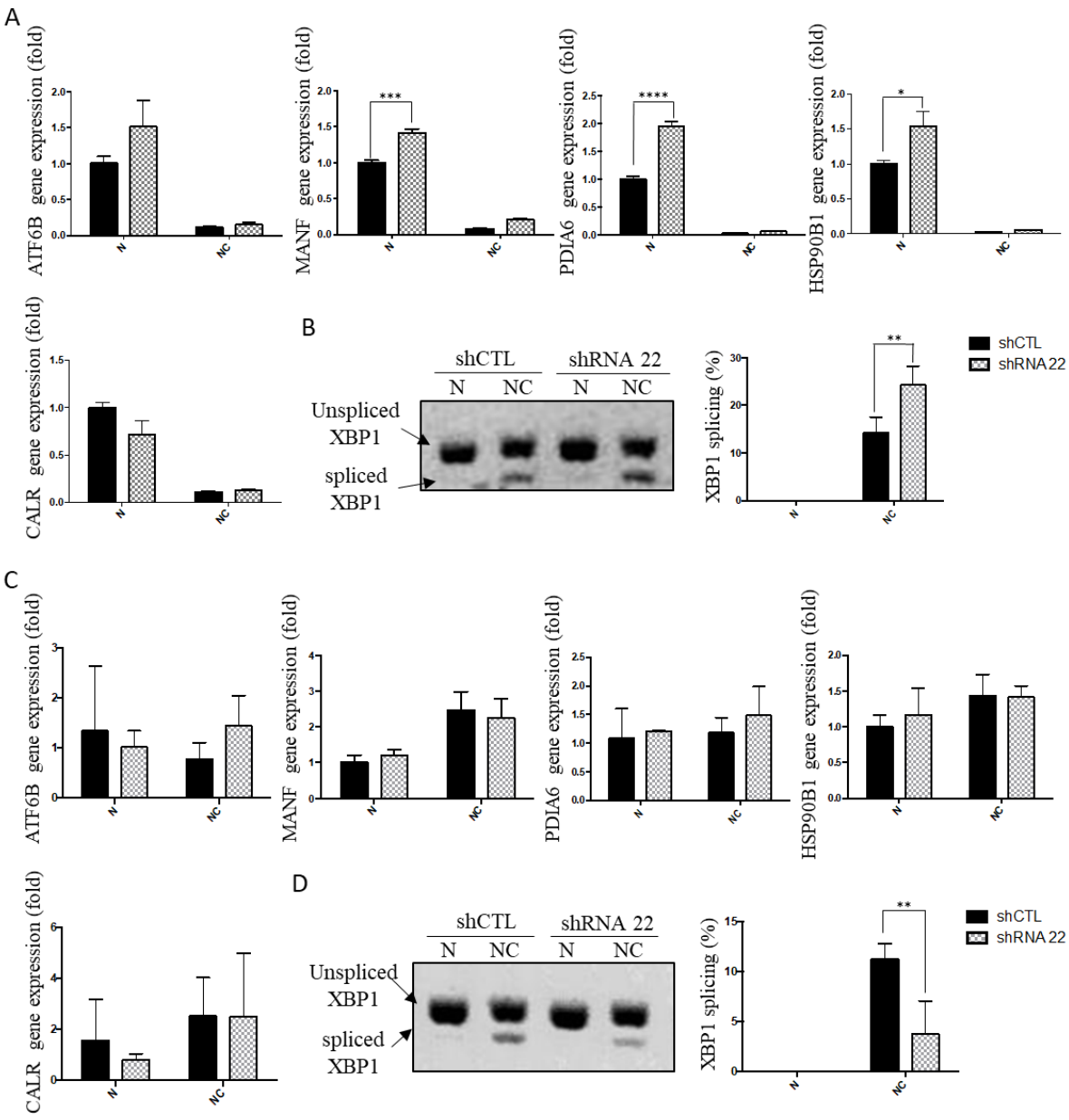

A
shCTL
shRNA 22
CTL 15' 30' 1h 2h 4h
CTL 15' 30' 1h 2h 4h
PARP
γH2AX
β-actin
γH2AX signal intensity normalized by actin
shCTL
shRNA 22
Without Cis
15 min
30 min
1h
2h
4h
B
shCTL
shRNA 22
CTL R0 R4h R20h CTL R0 R4h R20h
PARP
γH2AX
β-actin
PARP cleaved/PARP total normalized by actin
**
Without Cis
4h
R4h
R20h
shCTL
shRNA 22
γH2AX signal intensity normalized by actin
****
Without Cis
4h
R4h
R20h
C
shCTL
shRNA22
N NC N NC
ATM/ATR substrate phosphorylation profile
β-actin
D
shCTL
shRNA 22
N NC N NC
EYA3
β-actin
EYA3 signal intensity normalized by actin
shCTL
shRNA 22
N
NC

<u>Figure 5</u>: Effect of TMEM45A invalidation on the recruitment of RAD51 to DNA damage

SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). SQD9 cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic conditions for 4h then fresh medium without cisplatin was added to the cells for 4h. After the incubation, the recruitment of RAD51 was studied by confocal microscopy using anti-RAD51 antibody and Alexa 488 anti-rabbit antibody and the expression of γH_2AX was studied using anti-γH_2AX antibody and Alexa 488 anti-rabbit antibody. The nucleus was detected with Hoechst. Scale bars: 50 µm. The RAD51 signal intensity was quantified by Image J on more than 100 cells. Results are expressed as mean ± SD (n=3). * $p < 0.05$


nucleus
γH2AX
nucleus
rad51
shCTL
shRNA 22
Without drug
4h of Cisplatin
4h of recovery


% of positive cells to RAD51 staining
30
20
10
0
*
No Cis
R4h
No Cis
R4h
shCTL
shRNA 22

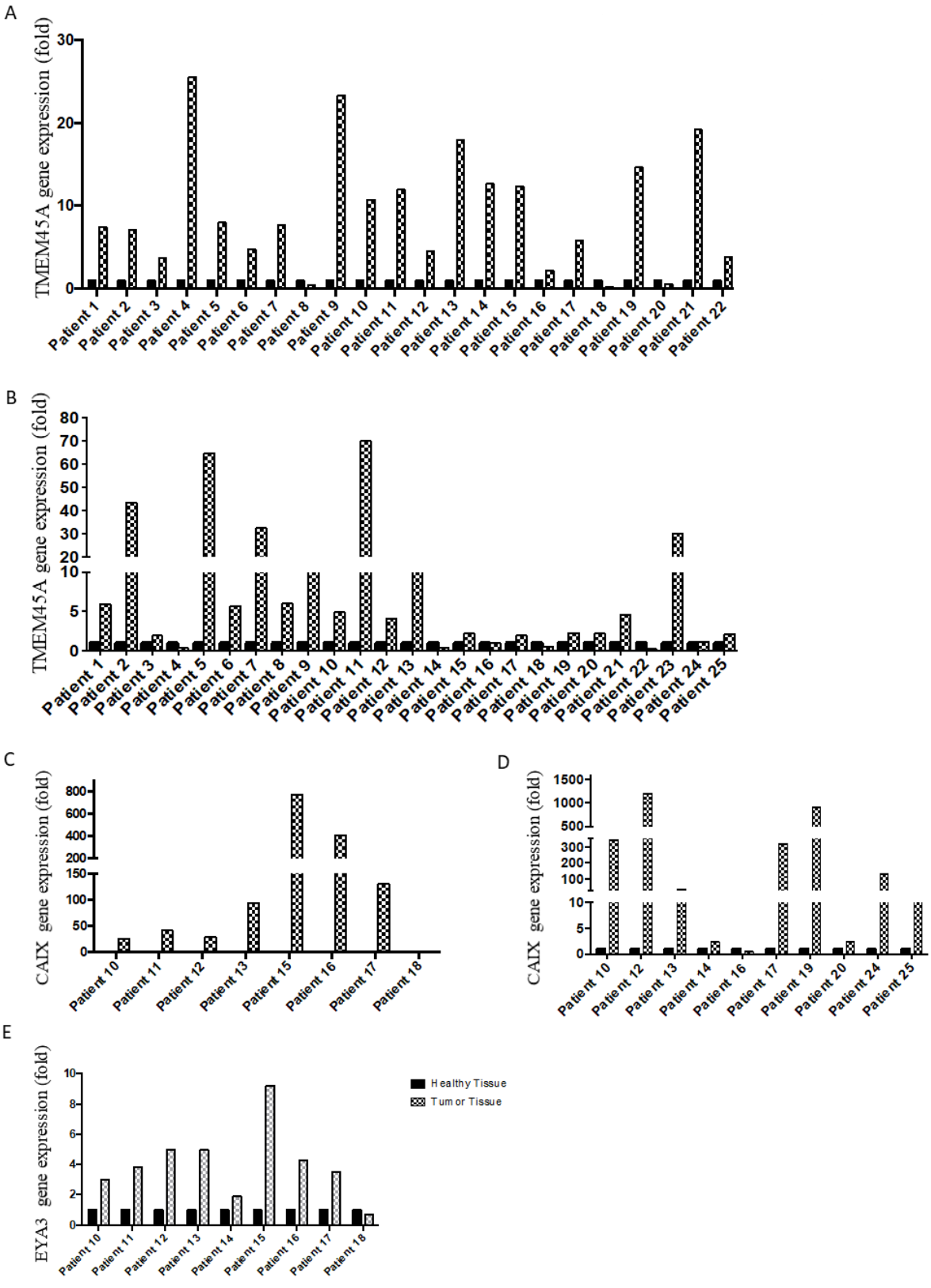


<u>Figure 6</u>: Effect of TMEM45A invalidation on UPR pathway activation

SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). The cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic conditions for 24h. (**A**) After mRNA extraction the expression level of several target genes of UPR pathway was assessed by RT-qPCR. (**B**) SQD9 cells were incubated with or without 20 µM of cisplatin in normoxic conditions for 48h. Splicing of XBP1 was assessed by PCR and migration on agarose gel. The signal intensity was measured by Image J. Results are expressed as mean ± SD (n=3). (**C**) RCC4 cells were incubated with or without 20 µM of cisplatin in normoxic conditions for 48h. After mRNA extraction the expression level of several target genes of UPR pathway was assessed by RT-qPCR. (**D**) Splicing of XBP1 was assessed by PCR and migration on agarose gel. The signal intensity was measured by Image J. Results are expressed as mean ± SD (n=3). * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ **** $p<0.0001$

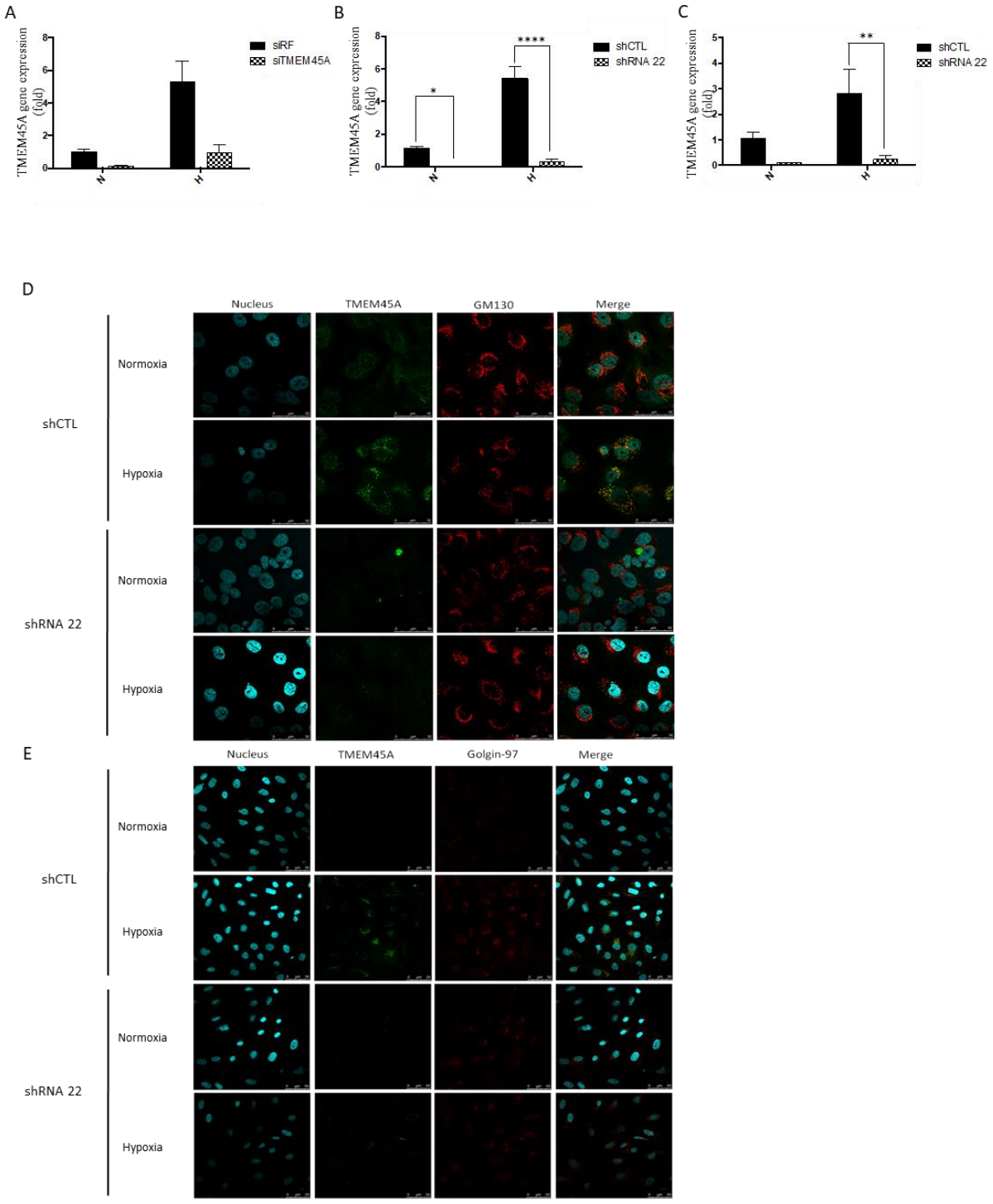
<u>Supplementary figure 1</u>: TMEM45A, CAIX and EYA3 expression in head and neck and renal cancers

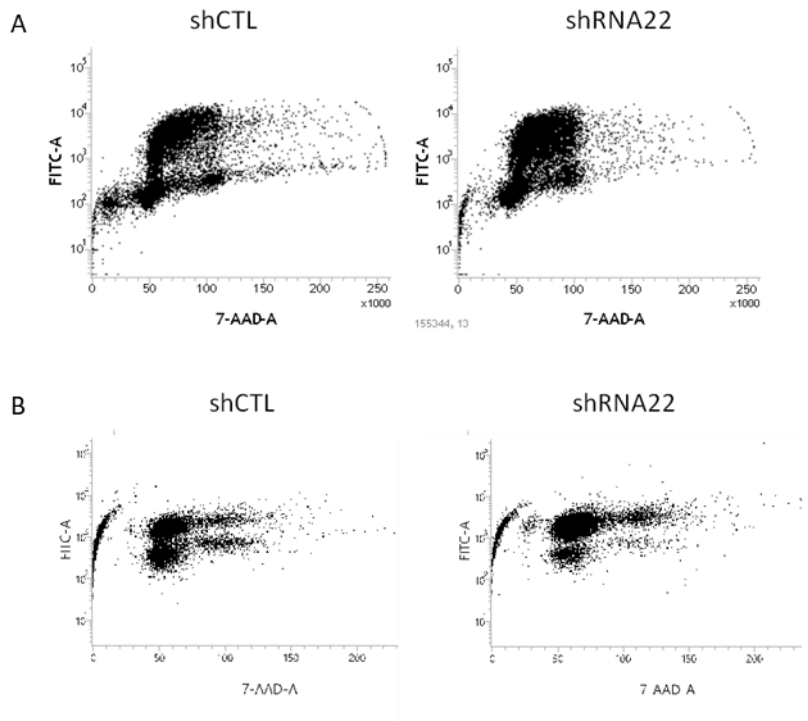
The expression level of TMEM45A was determined by RT-qPCR in 18 pairs of head and neck cancer biopsies and adjacent normal tissue (**A**) and in 25 pairs of renal cancer and adjacent normal tissue (**B**). The expression level of CAIX was determined by RT-qPCR in 8 pairs of head and neck cancer biopsies and adjacent normal tissue (**C**) and in 10 pairs of renal cancer biopsies and adjacent normal tissue (**D**). The expression level of EYA3 was determined by RT-qPCR in 9 pairs of head and neck cancer biopsies and adjacent normal tissue (**E**).


A
TMEM45A gene expression (fold)
B
TMEM45A gene expression (fold)
C
CAIX gene expression (fold)
D
CAIX gene expression (fold)
E
EYA3 gene expression (fold)
Healthy Tissue
Tumor Tissue

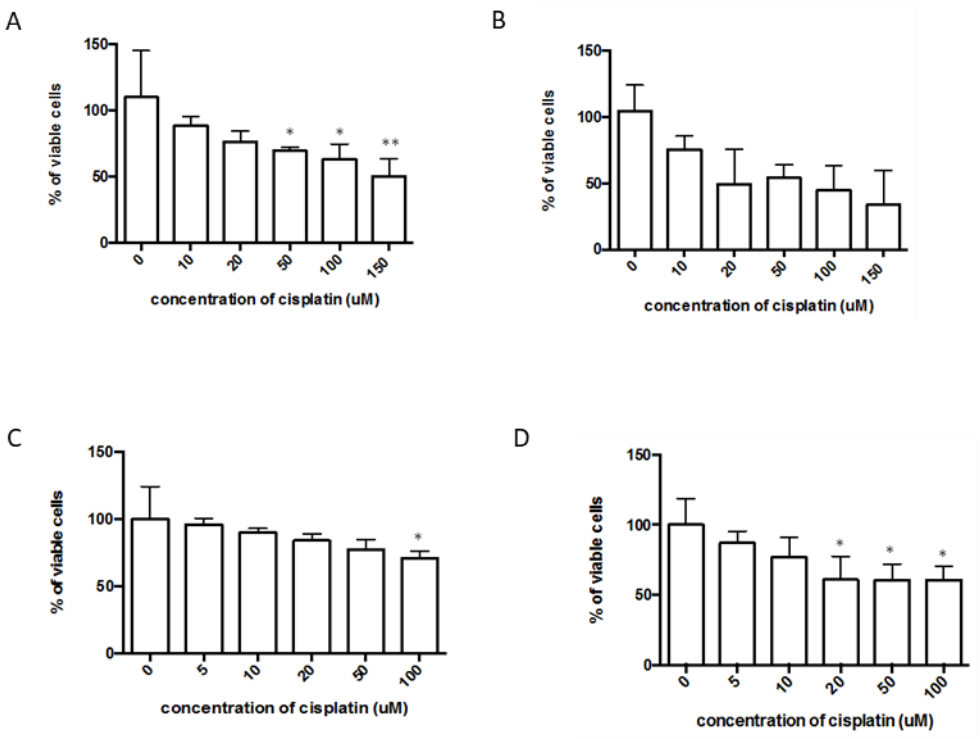
<u>Supplementary figure 2</u>: Knockdown of TMEM45A expression using siRNA or shRNA

SQD9 cells were transfected with siRNA control (siRF= risc free) or siRNA targeting the mRNA of TMEM45A (siTMEM45A). After the transfection, SQD9 cells were incubated in normoxic (N) or hypoxic (H) conditions for 24h and TMEM45A mRNA expression was determined by RT-qPCR (n=2) (**A**). SQD9 and RCC4 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). After the transduction, cells were incubated in normoxic (N) or hypoxic (H) conditions for 24h for SQD9 cells and 48h for RCC4 cells. The mRNA expression was determined by RT-qPCR in SQD9 cells (**B**) and RCC4 cells (**C**). Results are expressed as mean ± SD (n=3). * $p<0.05$ ** $p<0.01$ **** $p<0.0001$. The protein expression in SQD9 cells (**D**, n=1) and in RCC4 cells (**E**, n=3) was studied by confocal microscopy using anti-TMEM45A monoclonal antibody and Alexa 488 anti-rabbit antibody. Golgi was labeled with anti- Golgin-97 or GM130 and Alexa 568 anti-mouse antibody and nucleus was detected with Hoechst. Scale bars: 50 μm.


A
TMEM45A gene expression (fold)
siRF
siTMEM45A
N
H
B
TMEM45A gene expression (fold)
shCTL
shRNA 22
*
****
N
H
C
TMEM45A gene expression (fold)
shCTL
shRNA 22
**
N
H
D
Nucleus
TMEM45A
GM130
Merge
shCTL
Normoxia
Hypoxia
shRNA 22
Normoxia
Hypoxia
E
Nucleus
TMEM45A
Golgin-97
Merge
shCTL
Normoxia
Hypoxia
shRNA 22
Normoxia
Hypoxia

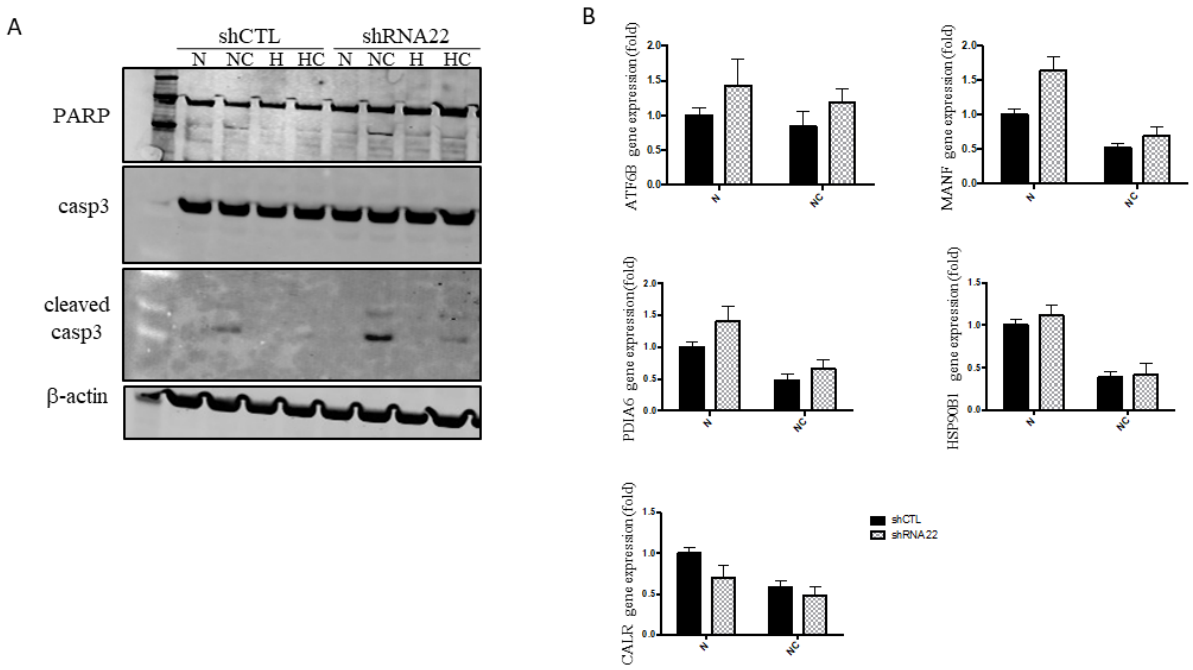


<u>Supplementary figure 3</u>: Effect of TMEM45A invalidation on cell cycle progression
SQD9 and RCC4 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). After the transduction, the cells were incubated 36h in normoxic conditions and the proliferation of SQD9 cells (**A**) and RCC4 cells (**B**) was analyzed by BrdU labeling and flow cytometry analysis (n=1).



<u>Supplementary figure 4</u>: Sensitivity to cisplatin in SQD9 and RCC4 cell lines

SQD9 and RCC4 cells were incubated with or without different concentrations of cisplatin for 24h (**A**, **C)** or 48h (**B**, **D**) in normoxic conditions. After the incubation, the number of viable cells was determined using MTT assay. Results are expressed as mean ± SD (n=3). One-way ANOVA was used to analyze the results. * $p<0.05$ ** $p<0.01$

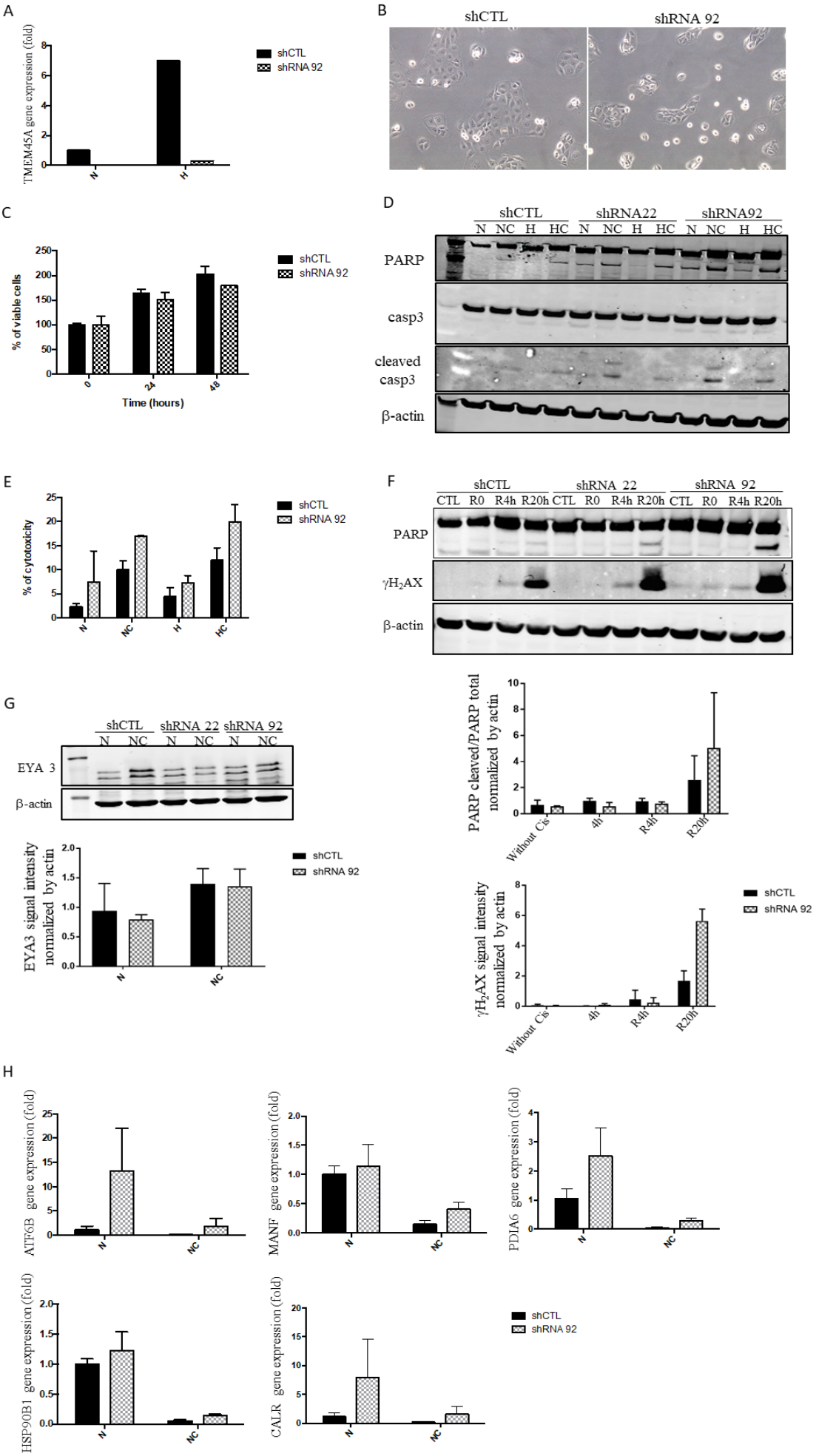


<u>Supplementary figure 5</u>: Effect of TMEM45A invalidation on SQD9 cells after incubation with cisplatin for 48h

SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). (**A**) SQD9 cells were incubated with or without 20 µM of cisplatin in normoxic (N) and hypoxic (H) conditions for 48h. After transduction and incubation, the cleavage of PARP and caspase 3 was assessed by western blot. Actin was used as the loading control (n=1). (**B**) SQD9 cells were incubated with or without 20 µM of cisplatin in normoxic conditions for 48h. After mRNA extraction, the expression level of several target genes of UPR pathway was assessed by RT-qPCR. Results are expressed as mean ± SD (n=3).

<u>Supplementary figure 6</u>: Effect of TMEM45A invalidation by shRNA 92 in SQD9 cells

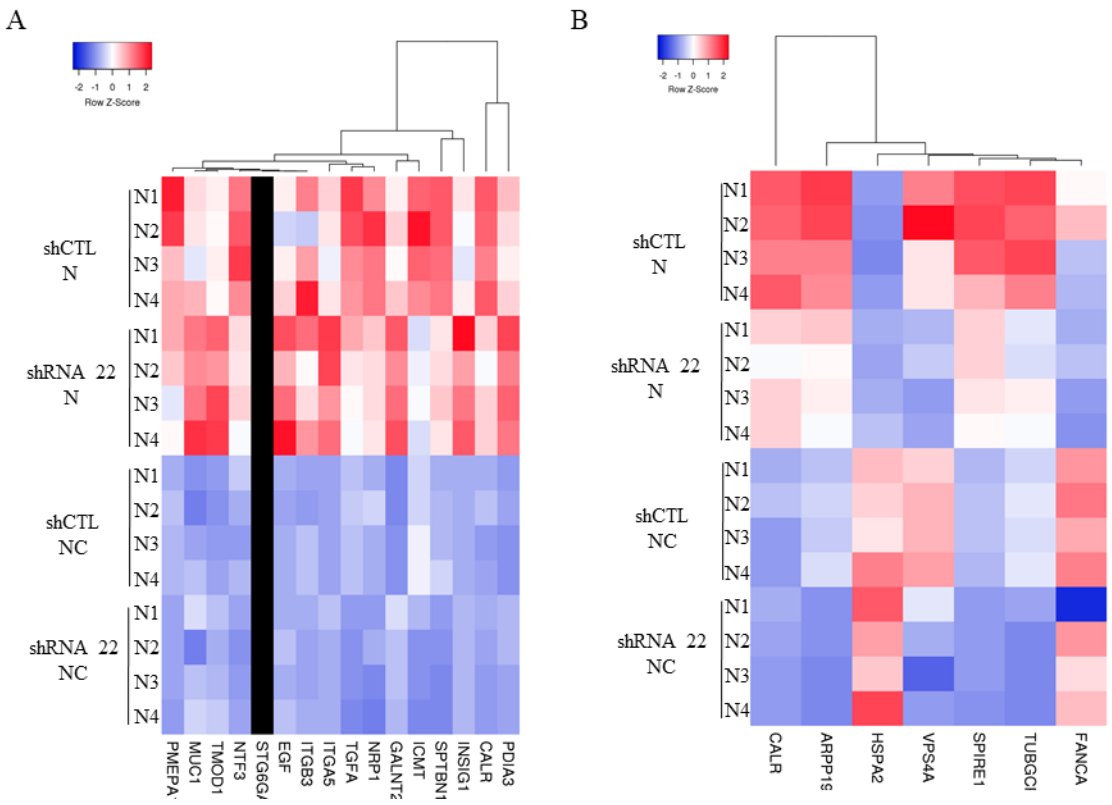
SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 92). (**A**) TMEM45A mRNA expression was determined by RT-qPCR. (**B**) After the induction, morphology was studied by microscopy (magnification x200). (**C**) The proliferation was assessed by MTT assay. The signal intensity at the seeding (time 0) was used to normalize the number of viable cells at different times. Results are expressed as mean ± SD (n=2). SQD9 cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic (N) and hypoxic (H) conditions for 48h. (**D**) After transduction and incubation, the cleavage of PARP and caspase 3 was assessed by western blot. Actin was used as the loading control (n=1). (**E**) After 40h of incubation, the cytotoxicity of cisplatin was assessed by LDH release. Results are expressed as mean ± SD (n=3). (**F**) SQD9 cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic conditions for 4h then fresh medium without cisplatin was added to the cells for 4h or 20h. After the incubation, proteins were extracted and PARP cleavage and γH_2AX protein level were assessed by western blot. Actin was used as the loading control. Results are expressed as mean ± SD (n=2). (**G**) Western blot of EYA3. Actin was used as loading control. Results are expressed as mean ± SD (n=3). (**H**) After mRNA extraction the expression level of several target genes of UPR pathway was assessed by RT-qPCR. Results are expressed as mean ± SD (n=3).


A
TMEM45A gene expression (fold)
shCTL
shRNA 92
N
H
B
shCTL
shRNA 92
C
% of viable cells
shCTL
shRNA 92
Time (hours)
D
shCTL
shRNA22
shRNA92
N NC H HC N NC H HC N NC H HC
PARP
casp3
cleaved casp3
β-actin
E
% of cytotoxicity
shCTL
shRNA 92
N
NC
H
HC
F
shCTL
shRNA 22
shRNA 92
CTL R0 R4h R20h CTL R0 R4h R20h CTL R0 R4h R20h
PARP
γH2AX
β-actin
G
shCTL
shRNA 22
shRNA 92
N NC N NC N NC
EYA 3
β-actin
EYA3 signal intensity normalized by actin
shCTL
shRNA 92
PARP cleaved/PARP total normalized by actin
Without Cis
4h
R4h
R20h
γH2AX signal intensity normalized by actin
H
ATF6B gene expression (fold)
MANF gene expression (fold)
PDIA6 gene expression (fold)
HSP90B1 gene expression (fold)
CALR gene expression (fold)
shCTL
shRNA 92

GSEA	
Unexposed cells	**Cells exposed to cisplatin**
B cell proliferation	anchored component of membrane
biomineral tissue development	antigen processing
DNA dependent DNA replication maintenance of fidelity	axonal fasciculation
DNA helicase activity	cell aggregation
DNA packaging complex	chemokine activity
DNA recombination	chromatin silencing
DNA replication initiation	DNA double strand breack processing
DNA strand elongation involved in DNA replication	DNA packaging complex
gluthathione metabolic process	ER nucleus signaling pathway
humoral immune response	exopeptidase activity
interferon gamma mediated signaling pathway	humoral immune response
keratinization	immunoglobulin complex
ligand cated channel activity	innate immune response in mucosa
lytic vacuole membrane	ion gated channel activity
MHC protein complex	microtubule end
mitotic recombination	myelin assembly
negative regulation of cardiac muscle tissue development	negative regulation of cardiac muscle tissue development
nuclear nucleosome	nuclear nucleosome
nuclear pore	odorant binding
odorant binding	olfactory receptor activity
positive regulation of interleukin 10 production	organ or tissue specific immune response
preribosome	polyol transport
protein N-linked glycosylation	preribosome
recombinational repair	protein trimerization
replication fork	response to type I interferon
response to type I interferon	rRNA transcription
rRNA metabolic process	SMN SM protein complex
solute cation symporter activity	tRNA metabolic process, modification and processing
strand displacement	cell cycle G2/M transition
telomere maintenance via recombination	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage
transcription factor activity direct ligand regulated sequence specific DNA binding	DNA damage response detection of DNA damage
regulation of G protein coupled receptor protein signaling pathway	nucleotide excision repair DNA damage recognition
endoplasmic reticulum to cytosol transport	protein localization to endoplasmic reticulum
regulation of cell cycle checkpoint	IRE1 mediated unfolded protein response
fatty acid catabolic process	fatty acid catabolic process
mitochondrial respiratory chain complex I biogenesis	phosphatidylserine acyl chain remodeling
regulation of vesicle fusion	platelet derived growth factor receptor signaling pathway
intrinsic apoptosic signaling pathway in response to DNA damage	regulation of transcription factor import into nucleus
IRE1 mediated unfolded protein response	mitotic cytokinesis
regulation of translation in response to stress	smad protein signal transduction
Babelomics	
Unexposed cells	**Cells exposed to cisplatin**
actomyosin structure organization	vesicles-mediated transport
protein import into nucleus	metabolic process
regulation of blood vessel	protein localization
unfolded protein response	cellular component organization
response to stress (hypoxia, abiotic, light, toxic substance)	organic substance metabolic process
intrinsic/extrinsic apoptotic signaling pathway	primary metabolic process
regulation of G-protein coupled receptor signalilng pathway	movement of cell
toll-like receptor signaling pathway	cell migration
fatty acid biosynthesis	platelet activation
regulation of GTPase activity	regulation of cellular component biogenesis
regulation of endocytosis	cellular response to organic substance
DNA damage response	cellular response to transforming growth factor beta stimulus
cell cycle G2/M phase transition	actin filament bundle organization
integrin signaling pathway	unfolded protein response
NF-kappaB import into nucleus	epithelial cell differentiation

Table 2: Principal deregulated pathways in SQD9 cells silenced for TMEM45A in the absence or the presence of cisplatin

SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). After the transduction, cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic conditions for 24h and the mRNA expression was assessed by RNA sequencing (n=4). Potential deregulated pathways were identified using bioinformatic analysis: Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) and Babelomics analysis. For GSEA analysis, the list of all deregulated genes was analyzed for significant enrichment of GO terms against the human RefSeq protein database (November 2009 release).



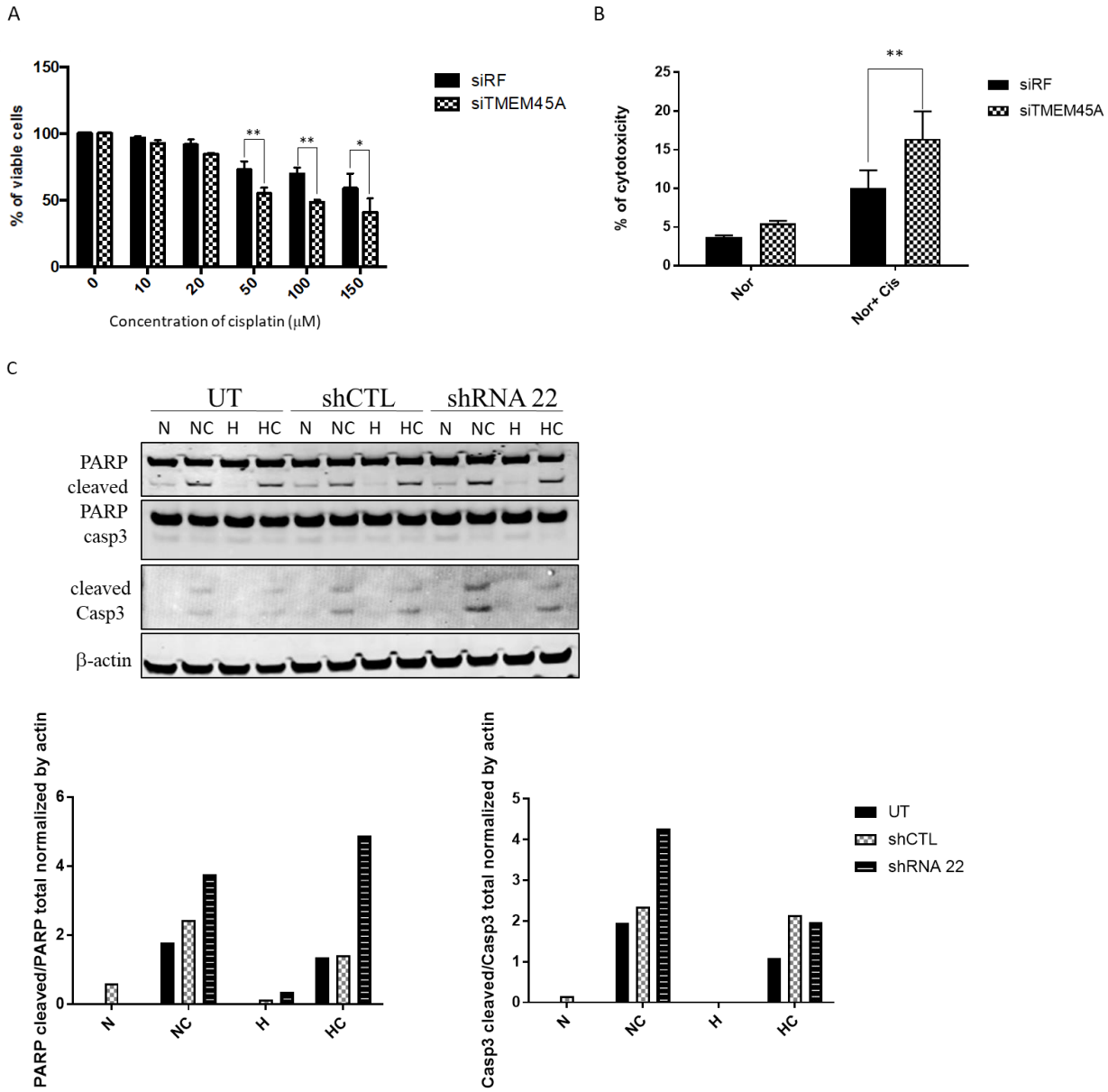
<u>Supplementary figure 8</u>: Effect of TMEM45A invalidation on protein modification and fatty acid biosynthesis pathways in SQD9 cells

SQD9 cells were transduced with lentiviral particles expressing shRNA control (shCTL) or shRNA targeting the mRNA of TMEM45A (shRNA 22). The cells were incubated with or without 100 µM of cisplatin in normoxic conditions for 24h. The transcriptome analysis was performed using Babelomics and GSEA after RNA sequencing. Heatmap of differentially expressed genes produced using Heatmapper (<u>http://www.heatmapper.ca</u>) (26) showed a potential deregulation of (**A**) protein modification and (**B**) fatty acid biosynthesis. Genes have been reordered by the method of average clustering. A dendrogram is shown for the clustering of genes. Genes with relatively high expression are marked in red, genes with relatively low expression are marked in blue.

Supplementary material and method

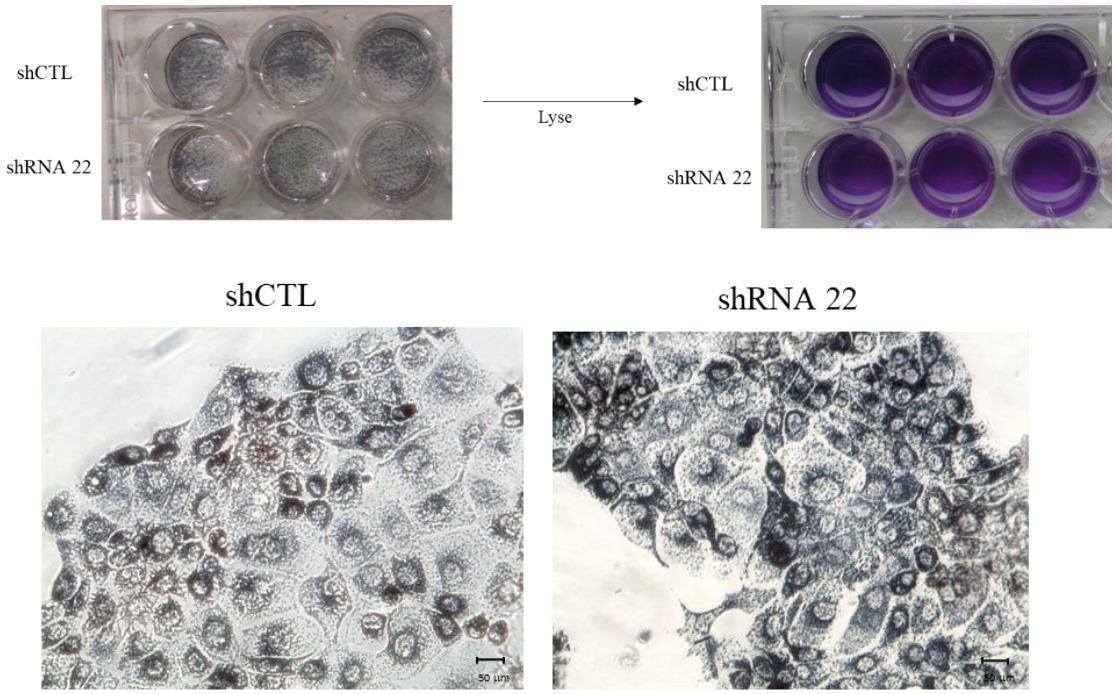
BrdU labelling by flow cytometry

After transduction, QD9 cells were seeded in T25 at 600 000 cells/flask. After 36h of incubation in normoxic condition the BrdU was added to culture medium at 10 µM during 45 minutes. Then, BrdU labelling was analysed by flow cytometry with BD Pharmingen BrdU flow kit following supplier's instructions.



<u>Figure R18</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur la chimiosensibilité des cellules SDQ9

(A et B) Les cellules SQD9 ont été transfectées avec des siARN contrôles (siARN Risc Free = siRF) ou des siARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (siTMEM45A). (A) Après transfection, les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de différentes concentrations de cisplatine durant 24h en condition de normoxie et la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Le pourcentage de viabilité a été calculé en normalisant par le signal obtenu pour les cellules incubées sans cisplatine. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (B) les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 100 µM de cisplatine durant 24h en condition de normoxie et d'hypoxie et la cytotoxicité du cisplatine a été mesurée par test LDH. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (C) Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22) ou non transduites (UT= untransduced). Après transduction, les cellules ont été incubées en absence ou en présence de 100 µM de cisplatine durant 24h et le clivage de PARP et caspase 3 a été analysé par western blot (n=1). Nor ou N : normoxie ; Nor+Cis ou NC : normoxie plus cisplatine ; Hyp ou H : hypoxie ; Hyp+Cis ou HC : hypoxie plus cisplatine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 2 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (*p<0,05 ; ** p<0,01).



<u>Figure R19</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'activité métabolique des cellules SQD9
Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction les cellules SQD9 ont été incubées 24h en condition de normoxie et la viabilité cellulaire a été analysée par test MTT. Avant la lyse des cellules, des images ont été prises au microscope optique afin de visualiser les cristaux de dérivés formazan violet accumulés au sein des cellules.

3. Résultats complémentaires

Comme présenté dans l'article, l'impact de l'invalidation de TMEM45A par shARN et siARN a été étudié dans les lignées SQD9 et RCC4 plus pVHL. Des expériences supplémentaires non présentées dans l'article aux vues du nombre restreint de figures autorisées ont été réalisées. Ces expériences permettent de compléter l'étude du phénotype des cellules invalidées pour TMEM45A.

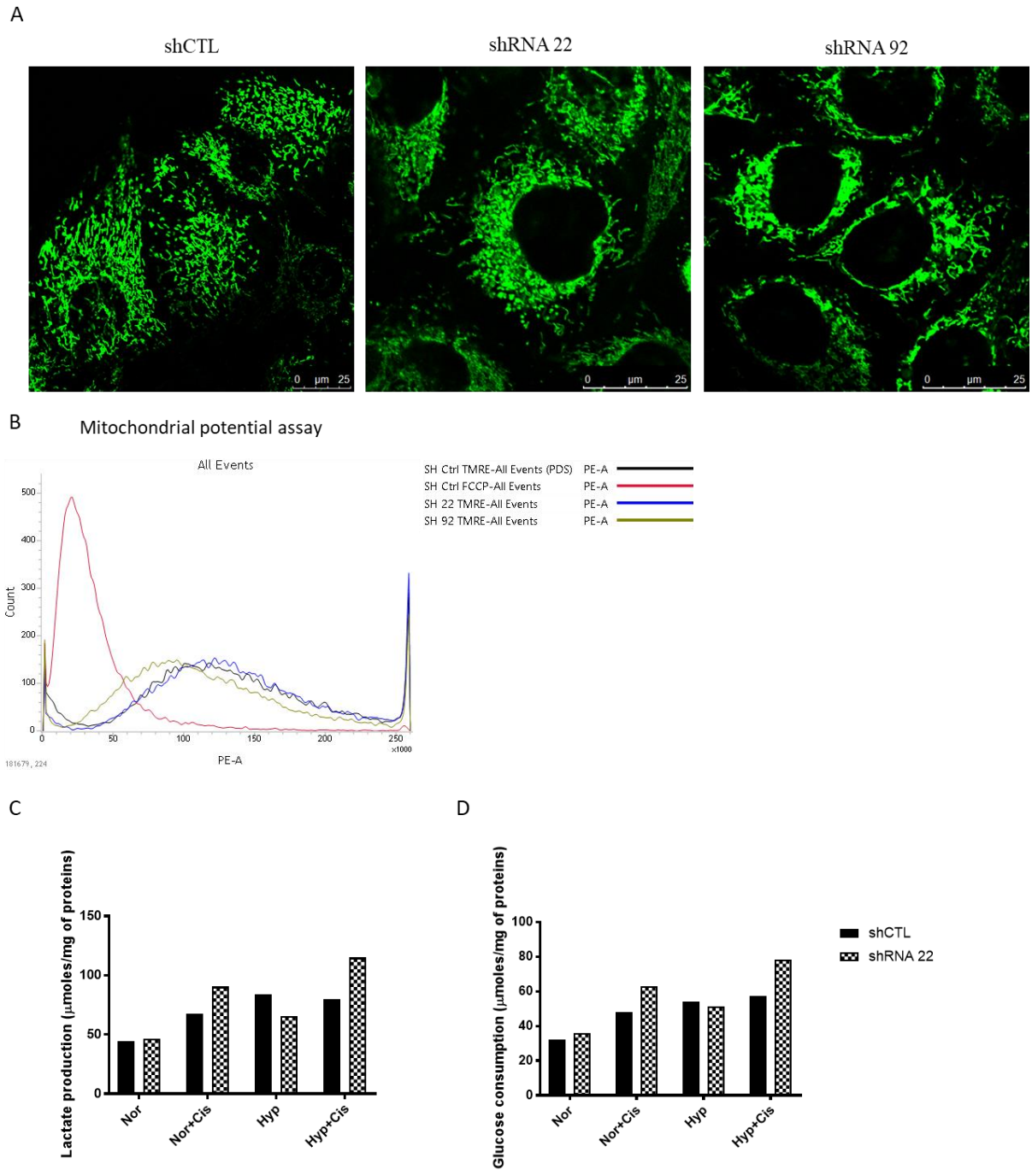
3.1 Impact de l'invalidation de TMEM45A par siARN dans les cellules SQD9

Après invalidation de TMEM45A par siARN, les cellules SQD9 ont été exposées à différentes concentrations de cisplatine puis la viabilité cellulaire a été mesurée par test MTT. La viabilité cellulaire des cellules SQD9 exposées au cisplatine diminue de façon croissante en fonction de la concentration en cisplatine. De plus, la viabilité cellulaire diminue plus fortement dans les cellules invalidées pour TMEM45A en comparaison aux cellules contrôles. Cette différence de sensibilité au cisplatine entre les cellules invalidées et les cellules contrôles est la plus marquée dans le cas des cellules exposées à 50 et 100 µM de cisplatine (figure R18A). A la vue des résultats de la figure R4B, nous avons décidé d'exposer les cellules SQD9 à 100 µM de cisplatine pendant 24h et non 150 µM pour la suite des expériences. Ainsi dans ces conditions, la cytotoxicité du cisplatine a été mesurée par test LDH. La cytotoxicité du cisplatine augmente dans les cellules invalidées pour TMEM45A en comparaison aux cellules contrôles (figure R18B).

Comme nous avions observé un effet de la transfection et de la transduction sur les cellules Cal27, nous avons vérifié si la transduction n'altérait pas la sensibilité des cellules SQD9 au cisplatine. Les résultats de la figure R18C indiquent que la sensibilité des cellules transduites contrôles est similaire aux cellules non transduites et donc que la transduction n'a pas d'effet sur la sensibilité des cellules SQD9 au cisplatine.

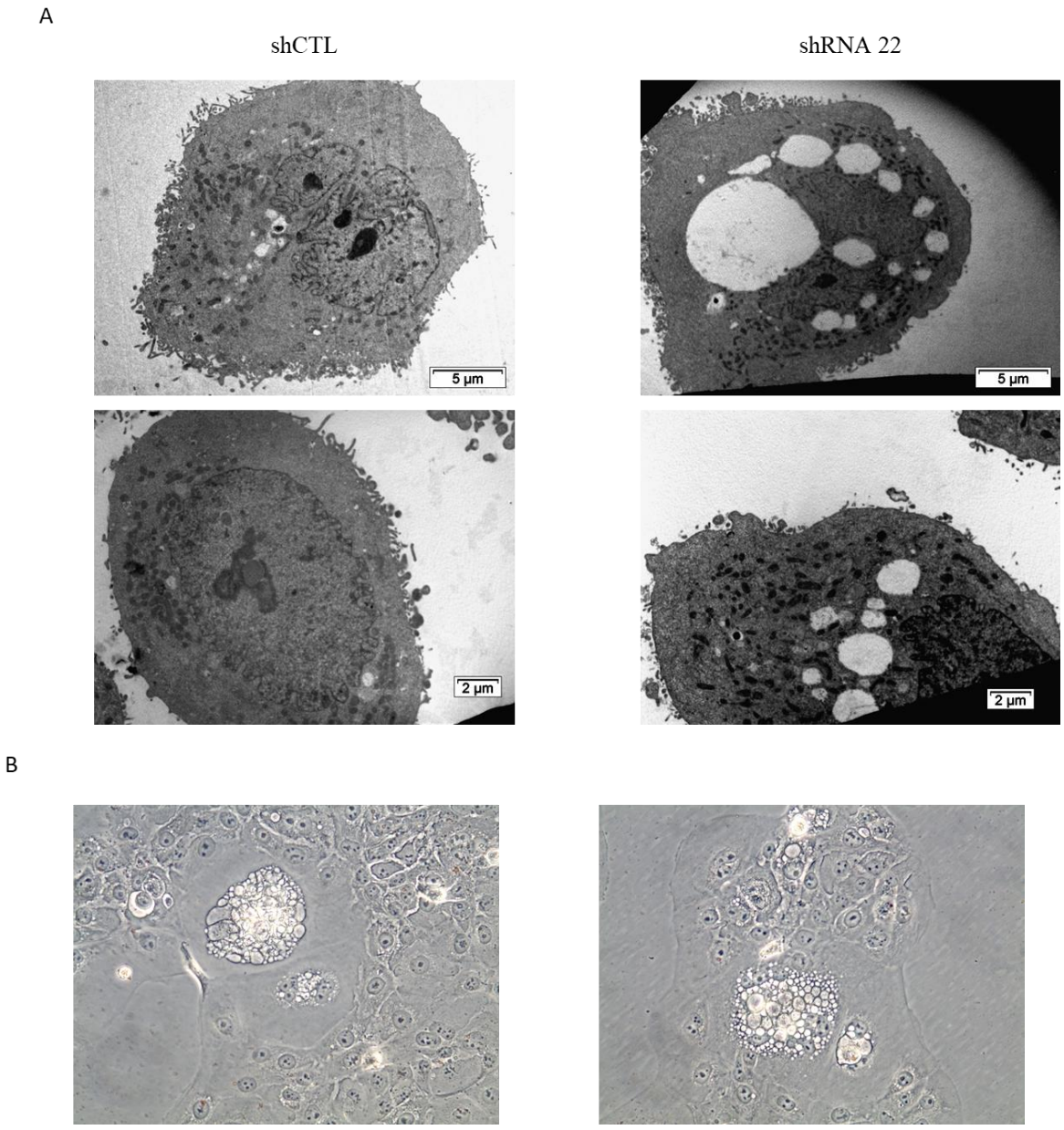
3.2 Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'activité mitochondriale des cellules SQD9

Outre les modifications morphologiques observées suite à l'invalidation de TMEM45A dans les cellules SQD9, une altération de l'activité métabolique des cellules invalidées pour TMEM45A a été observée. En effet, lors de la réalisation de test MTT, des problèmes ont été rencontrés. Le test de viabilité MTT est basé sur l'activité métabolique des cellules. En effet, la réduction du sel de tétrazolium en dérivé formazan est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Dans le cas des expériences réalisées avec les cellules SQD9 transduites par des shARN, une incohérence a été observée entre la taille du tapis cellulaire observé au microscope



<u>Figure R20</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'activité mitochondriale des cellules SQD9

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22 ou shRNA 92). (A) Après transduction les cellules SQD9 ont été incubées 24h en condition de normoxie puis le réseau mitochondrial a été marqué à l'aide d'un MitoTracker vert fluorescent. Les images ont été prises avec un microscope confocal (n=1). (B) Les cellules SQD9 ont été incubées 24h en normoxie et le potentiel de membrane mitochondriale a été étudiée par cyrtométrie en flux (n=1). Les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 100 µM de cisplatine durant 24h en conditions de normoxie et d'hypoxie puis la production de lactate (C) et la consommation de glucose (D) ont été mesurées (n=1). Nor : normoxie ; Nor+Cis: normoxie plus cisplatine; Hyp : hypoxie; Hyp+Cis: hypoxie plus cisplatine.

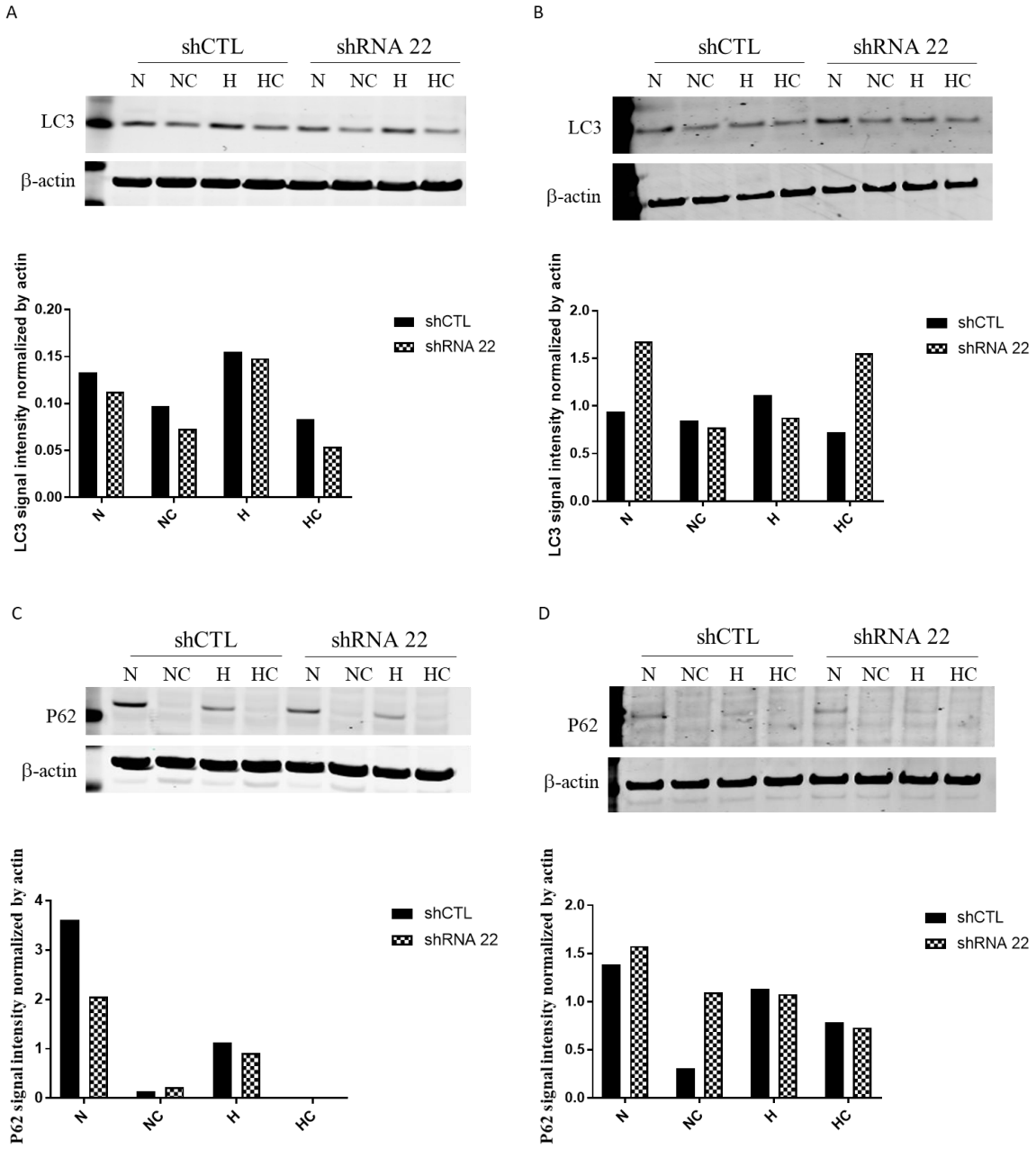


<u>Figure R21</u> : Présence de vésicules dans les cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A
Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, la morphologie des cellules SQD9 et en particulier la présence de vésicule a été étudiée (A) par microscopie électronique et (B) par microscopie optique à contraste de phase.

optique et la densité optique mesurée après solubilisation du dérivé formazan. En effet, comme présenté dans la figure R19, la densité du tapis cellulaire des cellules invalidées pour TMEM45A est nettement inférieure à celle des cellules contrôles. Cependant, après lyse et solubilisation du dérivé formazan, la densité optique mesurée était similaire entre les deux conditions, biaisant ainsi les résultats quant au nombre de cellules vivantes estimées. Des observations au microscope optique avant solubilisation du dérivé formazan a permis de voir une plus grande quantité de composés violets au sein des cellules invalidées pour TMEM45A en comparaison aux cellules contrôles. Ces résultats signifient que l'activité métabolique des cellules invalidées est modifiée par rapport aux cellules contrôles. Ceci explique la discordance entre l'absorbance et le nombre réel de cellules. La réaction enzymatique sur laquelle est basée le test MTT repose principalement sur la succinate déshydrogénase, ou complexe II de la chaine respiratoire mitochondriale. Nous avons donc par la suite étudié une possible altération du réseau mitochondrial. Pour cela, deux expériences ont été réalisées, un marquage fluorescence du réseau mitochondrial à l'aide de MitoTracker vert et une expérience de cyrtométrie en flux après incorporation de TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester). Ces deux expériences mesurent le potentiel de membrane des mitochondries. Dans le cas des expériences de MitoTracker, une légère désorganisation du réseau mitochondrial, et plus particulièrement une perte de l'organisation filamenteuse, a été observée dans les cellules invalidées pour TMEM45A en comparaison aux cellules contrôles (figure R20A). Cependant aucune modification de l'intensité du marquage n'a été observée. De plus les expériences de cytométrie en flux ne montrent aucune altération du potentiel de membrane dans le cas des cellules invalidées pour TMEM45A (figure R20B). Ces résultats suggèrent que l'invalidation de TMEM45A n'a pas d'effet sur le potentiel de membrane mitochondrial.

Pour finir, nous avons étudié l'activité glycolytique des cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A. Pour cela, les cellules SQD9 contrôles et invalidées pour TMEM45A ont été incubées en présence de 100 µM de cisplatine durant 24h en condition de normoxie et d'hypoxie. Puis la consommation de glucose et la production de lactate ont été mesurées et normalisées par la quantité de protéine totale. Les cellules invalidées pour TMEM45A semblent avoir une activité glycolytique plus importante que les cellules contrôles en présence de cisplatine (figures R20C et R20D).

Des analyses en microscopie électronique ont permis d'observer plus précisément les différences morphologiques observées entre les cellules invalidées pour TMEM45A et les cellules contrôles, notamment la présence de larges vésicules (figure R21A). Nous avons testé si les vésicules observées pouvaient être des gouttelettes lipidiques. Pour cela nous avons effectué une coloration Oil Red O permettant de visualiser les gouttelettes lipidiques. Malheureusement, aucune coloration n'a pu être observée signifiant que ces vésicules ne sont pas de nature lipidique (figure R21B). La présence de ces vésicules pourrait également être expliquée par une induction de l'autophagie au sein des cellules invalidées pour TMEM45A.



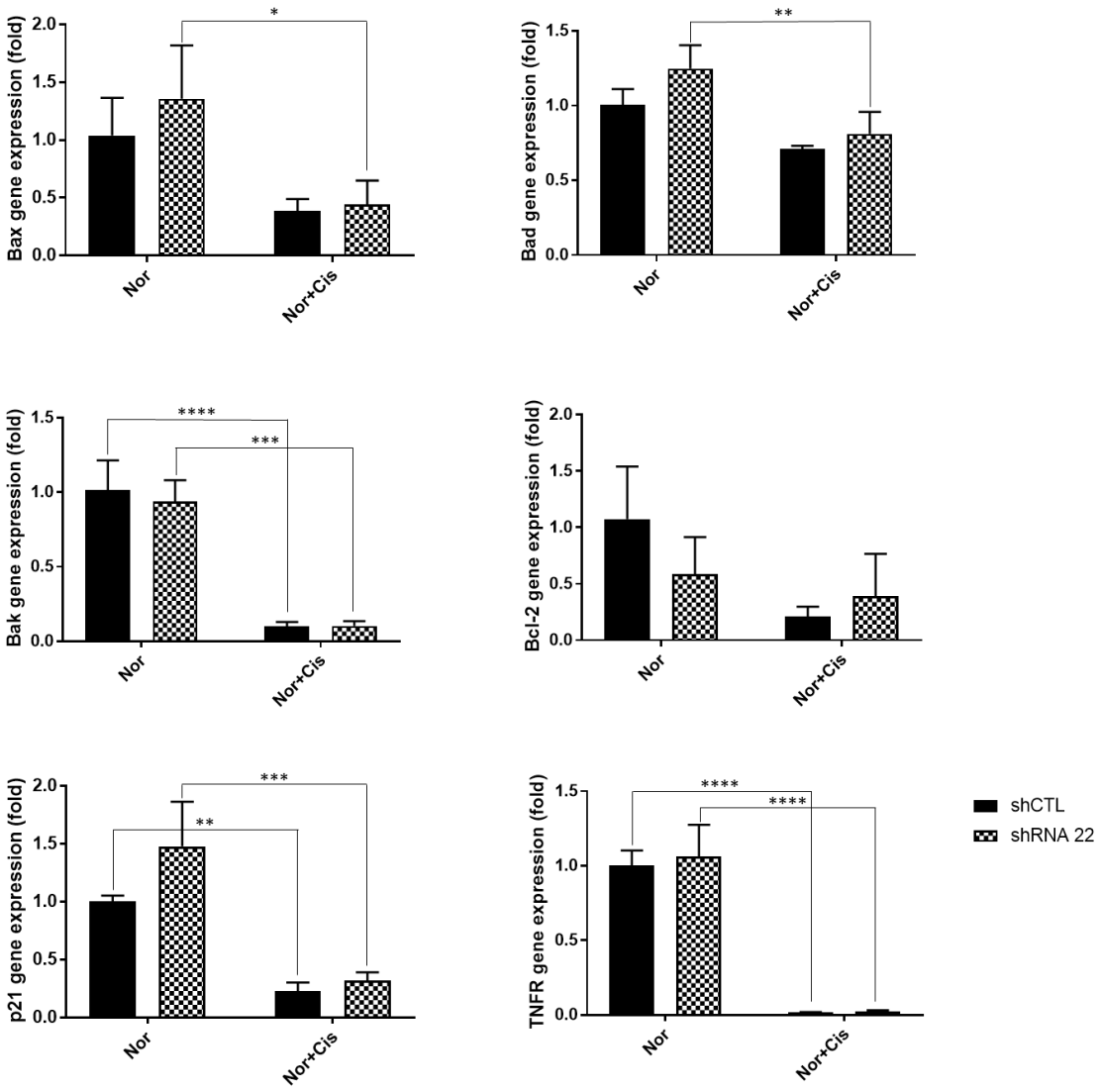
<u>Figure R22</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'autophagie dans les cellules SQD9

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 100 µM de cisplatine durant 24h en conditions de normoxie et d'hypoxie. (A et B) L'abondance de la protéine LC3 a été étudiée par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les figures A et B représentent deux réplicats biologiques indépendants. (C et D) L'abondance de la protéine P62 a été étudiée par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les figures A et B représentent deux réplicats biologiques indépendants. N : normoxie ; NC : normoxie plus cisplatine ; H : hypoxie ; HC : hypoxie plus cisplatine.

L'autophagie se caractérise par la séquestration d'une partie du cytoplasme et des organites cellulaires dans des vacuoles à double membrane ou multi-membranes appelées autophagosomes ou vacuoles autophagiques. L'autophagie peut être induite lors d'un stress cellulaire tel que la carence en nutriment ou l'hypoxie. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'abondance protéique de deux marqueurs de l'autophagie, LC3 et p62. Lorsque l'autophagie est induite, LC3 présent sous forme cytosolique, se lie au phagosome et intervient dans la formation et l'élongation des autophagosomes, on parle alors de forme conjuguée LC3, LC3 II (LC3-phosphatidylethanolamine conjugate). Ainsi, deux bandes sont attendues en western blot, une pour la forme cytosolique et une pour la forme conjuguée de LC3. Or, une seul une bande a été détectée. L'augmentation de l'abondance de LC3, signe d'induction de l'autophagie, n'a été observée en condition d'hypoxie que dans le premier réplicat, et ce en présence ou en absence de TMEM45A (figure R22A). De plus, nous pouvons remarquer que l'abondance de LC3 semble diminuée dans les cellules exposées au cisplatine (figures R22A et R22B). Ces résultats suggèrent que la mort cellulaire induite par le cisplatine ne fait pas intervenir le processus d'autophagie. Cependant, le niveau d'expression de LC3 ne reflète pas forcément de changement du flux autophagique. Il serait donc intéressant de réaliser des expériences de marquage en immunofluorescence de LC3 afin de visualiser son recrutement aux membranes des autophagosomes. Le second marqueur étudié est p62 appelé aussi sequestosome (SQSTM1). La protéine p62 permet la prise en charge spécifique de protéines ubiquitinylées par les autophagosomes en se liant à la fois à l'ubiquitine et à la protéine LC3. Lors du processus d'autophagie, p62 se retrouve dégradé. Dans le cas du premier réplicat (figure R22C), le niveau d'abondance de p62 diminue en hypoxie signe d'une induction de l'autophagie en hypoxie. Cependant, les résultats obtenus ont montré une grande variabilité entre les reliquats biologiques effectués et ne nous permettent pas de conclure quant à une éventuelle modification du niveau d'expression de p62 dans les cellules invalidées pour TMEM45 (figures R22C et R22D). A ce stade de l'étude, la nature de ces vésicules reste un mystère.

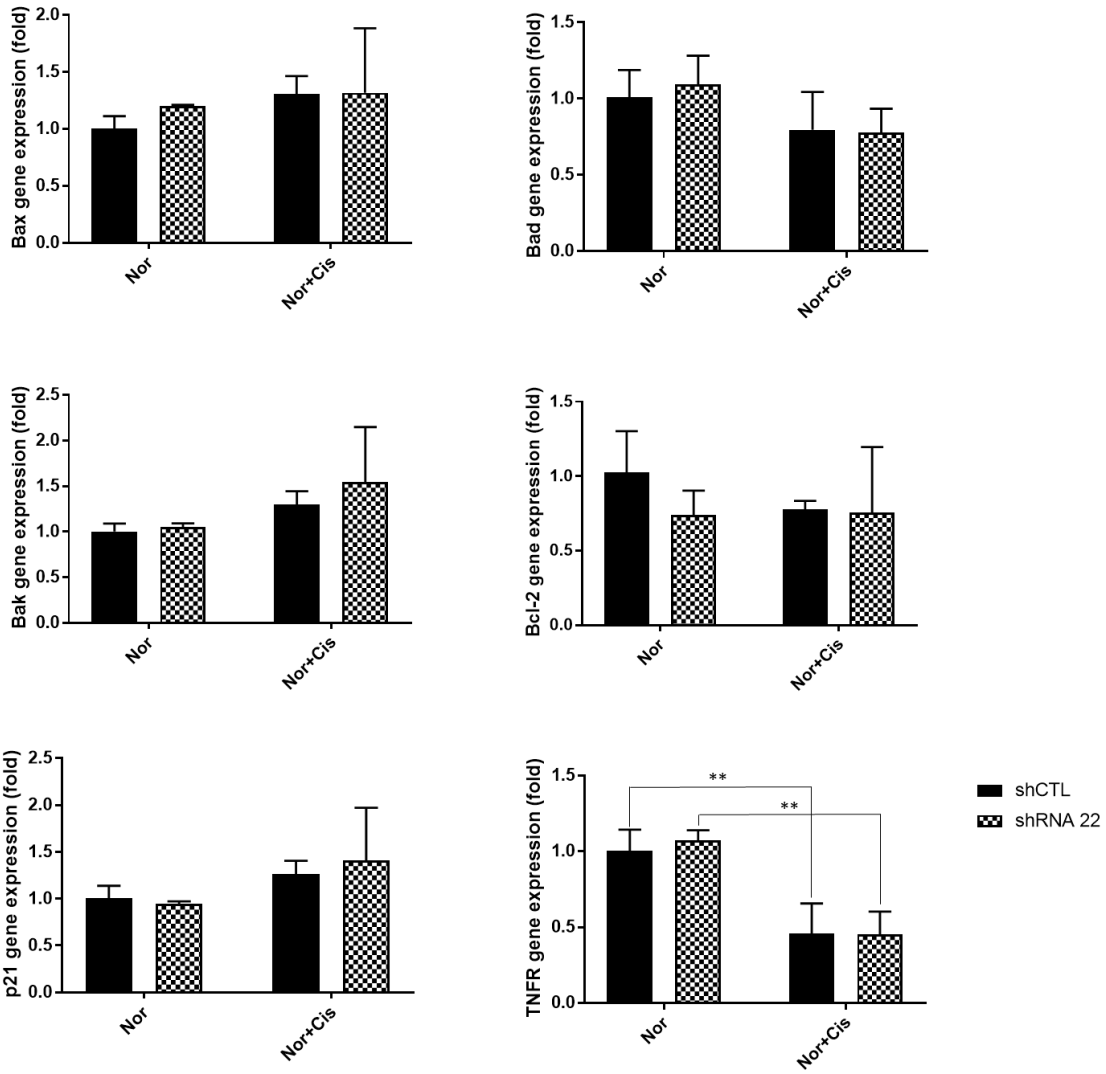
3.3 Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'expression des protéines pro-apoptotiques dans les cellules SQD9

Comme présenté dans le chapitre 7 de l'introduction, de nombreuses voies de signalisation sont capables de moduler la réponse des cellules cancéreuses face aux agents chimiothérapeutiques. Il y a par exemple, les voies de réparation des dommages à l'ADN ou l'activation de la voie UPR, voies explorées dans l'article présenté ci-avant. Une modulation du niveau d'expression de gènes codants pour des protéines impliquées dans la mort cellulaire peut également expliquer une différence de sensibilité à un agent chimiothérapeutique. Cette possibilité a été explorée par l'étude du niveau d'expression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et p21 mais également pro-apoptotiques telles que Bax, Bad et Bak. De plus, la voie



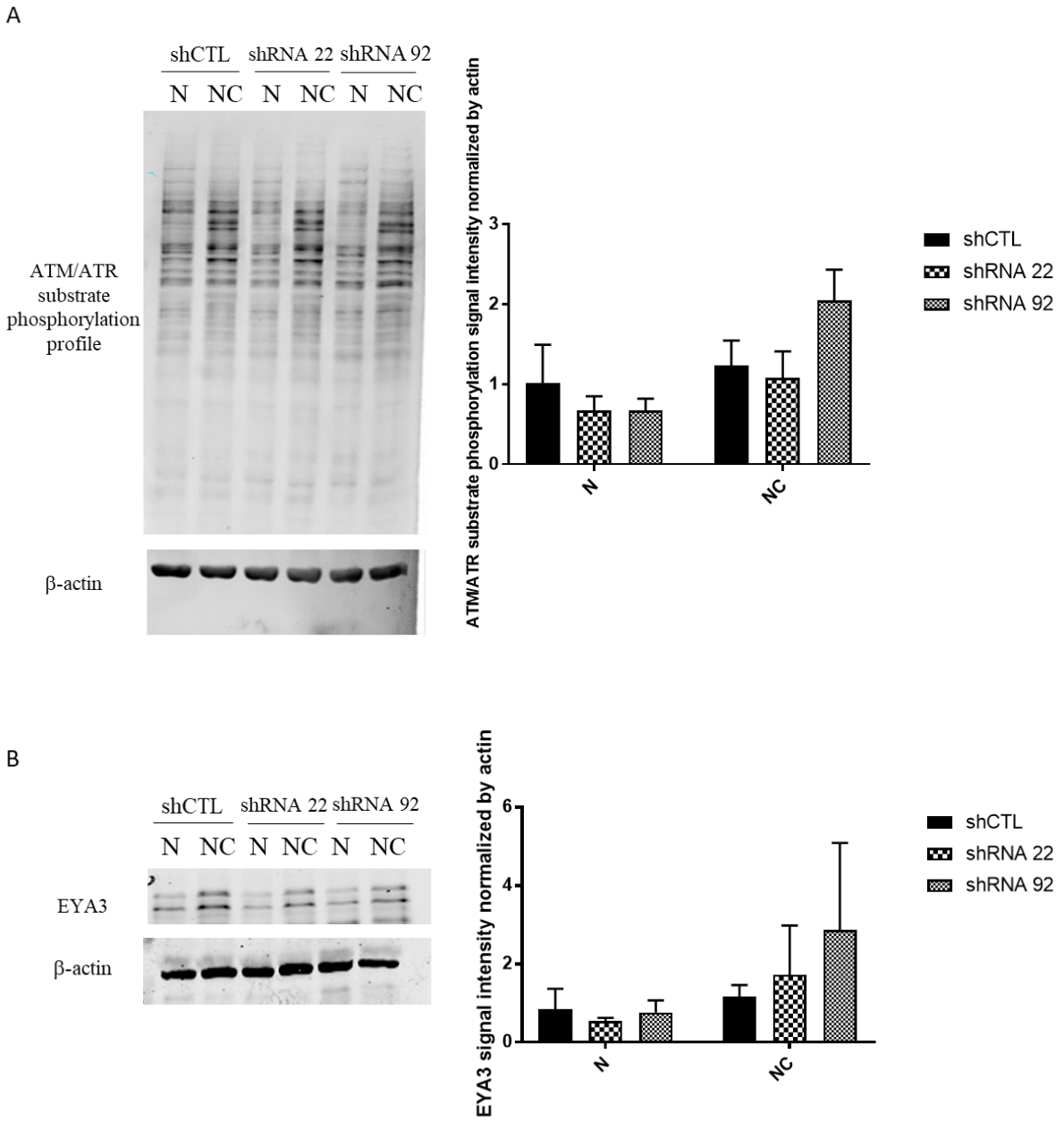
<u>Figure R23</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'expression de protéines pro et anti apoptotiques suite à une exposition au cisplatine de 24h dans les cellules SQD9

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 100 µM de cisplatine durant 24h en condition de normoxie. Après incubation, les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression des ARNm des gènes *Bax*, *Bad* et *Bak*, *Bcl-2*, *p21 et TNFR* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). Nor : normoxie ; Nor+Cis : normoxie plus cisplatine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 2 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (*p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001).



<u>Figure R24</u> : impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'expression de protéines pro et anti apoptotiques suite à une exposition au cisplatine de 48h dans les cellules SQD9

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 20 µM de cisplatine durant 48h en condition de normoxie. Après incubation, les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression des ARNm des gènes *Bax*, *Bad* et *Bak*, *Bcl-2, p21 et TNFR* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3 excepté pour *Bax* avec n=2). Nor : normoxie ; Nor+Cis : normoxie plus cisplatine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 2 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (**p<0,001).



<u>Figure R25</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45 sur la détection des dommages à l'ADN dans les cellules SQD9 exposées au cisplatine durant 48h

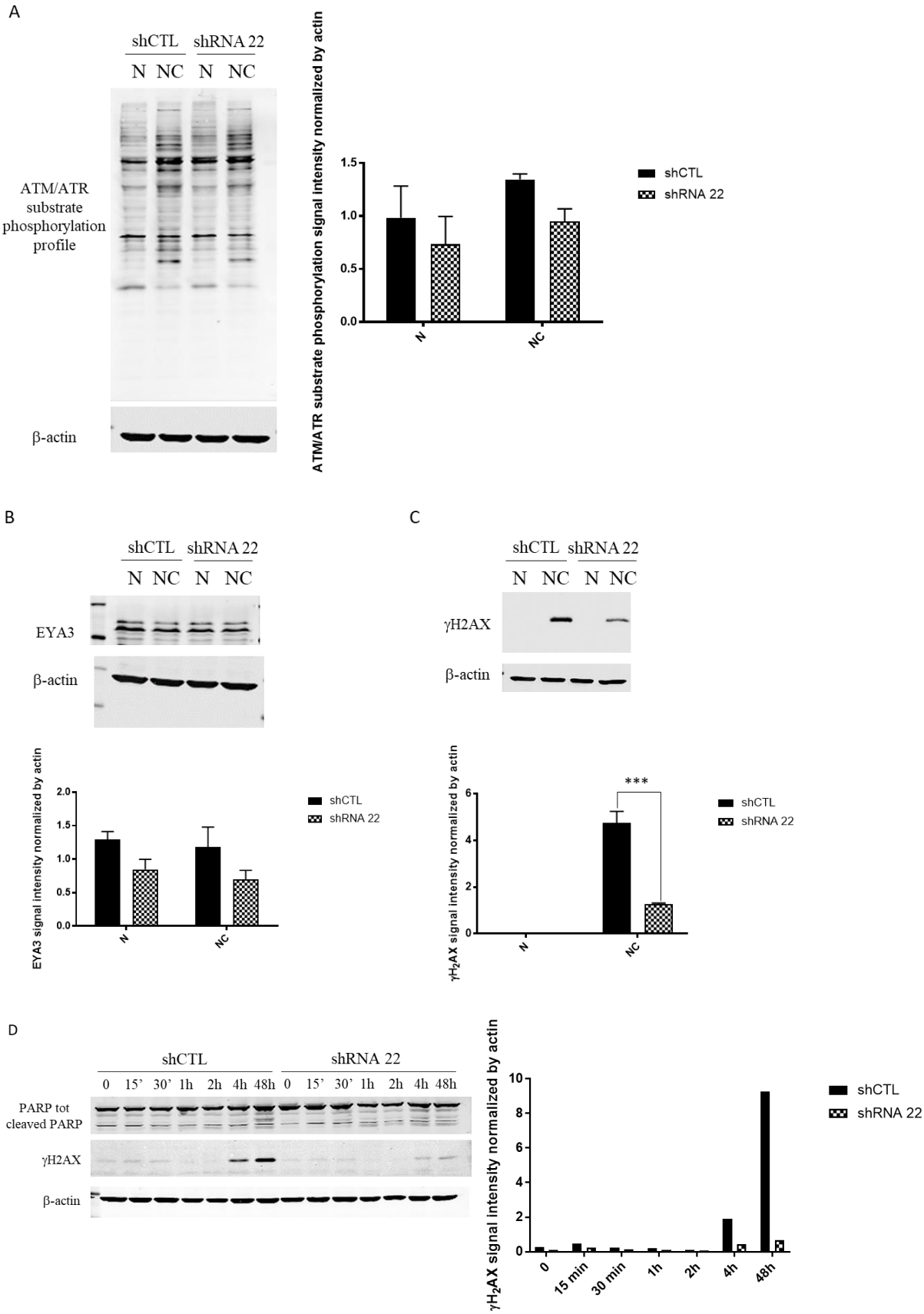
Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 20 µM de cisplatine durant 48h en condition de normoxie. Après incubation, les protéines ont été extraites puis (A) le profil de phosphorylation des protéines cibles d'ATM et ATR et (B) l'abondance de la protéine EYA3 ont été analysés par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). N : normoxie ; NC : normoxie plus cisplatine.

extrinsèque de l'apoptose a également été investiguée via le niveau d'expression du récepteur de mort cellulaire TNFR. Pour cela, les cellules SQD9 contrôles et invalidées pour TMEM45A ont été incubées en présence soit de 20 μM de cisplatine durant 48h, soit 100 μM de cisplatine durant 24h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après extraction d'ARN, le niveau d'expression de gènes a été analysé par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence.

Une exposition de 24h au cisplatine entraine une diminution du niveau d'expression de l'ensemble des gènes étudiés. De plus, aucune modification du niveau d'expression de ces gènes n'a été observée dans les cellules invalidées pour TMEM45A par rapport aux cellules contrôles (figure R23). Une exposition de 48h au cisplatine n'entraine aucune modulation du niveau d'expression des différents gènes étudiés excepté TNFR dont l'expression est diminuée de moitié lorsque les cellules sont incubées en présence de cisplatine. A nouveau, aucune différence n'a été observée entre les cellules contrôles et les cellules invalidées pour TMEM45A (figure R24). Le niveau d'expression de Bcl-2 dans ce type cellulaire est très faible, il serait donc intéressant d'aller étudier le niveau d'expression d'une autre protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2, Bcl-X_L. De plus, ici nous avons étudié le niveau d'expression de l'ARNm des différents gènes, cela ne signifie pas que le niveau d'expression ou d'activation des protéines codées par ces gènes n'est pas modifié dans les cellules invalidées. Dès lors il serait très intéressant d'investiguer cette piste. L'ensemble de ces résultats nous indique que l'invalidation de TMEM45A n'a aucun impact sur le niveau d'expression des gènes codant pour les protéines p21, Bcl-2, Bax, Bak, Bad et TNFR. De plus, la modulation de l'expression de ces gènes par une exposition au cisplatine varie en fonction du temps d'exposition à la drogue. Il est alors possible que les réponses cellulaires ainsi que les mécanismes de résistance mis en place par la cellule face à une exposition au cisplatine soient différents en fonction du timing étudié.

Nous avons alors analysé le profil de phosphorylation des cibles des protéines ATM/ATR en réponse aux dommages à l'ADN et l'abondance de la protéine EYA3 après une exposition de 48h au cisplatine. Ces expériences ont pour but de vérifier si un changement du temps d'exposition au cisplatine n'a pas d'impact sur l'induction ou la reconnaissance des dommages à l'ADN. Le profil de phosphorylation des cibles de ATM et ATR n'est pas altéré dans les cellules invalidées pour TMEM45A (figure R25A) suggérant que même après une exposition au cisplatine de 48h la détection des dommages à l'ADN par ATM et ATR n'est pas modifiée par l'invalidation de TMEM45A.

De façon surprenante, le niveau d'abondance de la protéine EYA3 n'est plus diminué dans les cellules invalidées pour TMEM45A exposées au cisplatine durant 48h contrairement aux cellules invalidées pour TMEM45A exposées au cisplatine durant 24h (figure R25B). Ces informations suggèrent que la durée d'exposition des cellules au cisplatine module le niveau d'abondance de la protéine EYA3. Ainsi il est possible que l'augmentation de la chimiosensibilité des cellules invalidées pour TMEM45A après une exposition au cisplatine de


A
shCTL
shRNA 22
N NC N NC
ATM/ATR substrate phosphorylation profile
β-actin
ATM/ATR substrate phosphorylation signal intensity normalized by actin
1.5
1.0
0.5
0.0
N
NC
shCTL
shRNA 22
B
shCTL
shRNA 22
N NC N NC
EYA3
β-actin
EYA3 signal intensity normalized by actin
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
N
NC
shCTL
shRNA 22
C
shCTL
shRNA 22
N NC N NC
γH2AX
β-actin
γH2AX signal intensity normalized by actin
***
6
4
2
0
N
NC
shCTL
shRNA 22
D
shCTL
shRNA 22
0 15' 30' 1h 2h 4h 48h 0 15' 30' 1h 2h 4h 48h
PARP tot
cleaved PARP
γH2AX
β-actin
γH2AX signal intensity normalized by actin
10
8
6
4
2
0
0
15 min
30 min
1h
2h
4h
48h
shCTL
shRNA 22

<u>Figure R26</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'induction des dommages à l'ADN dans les cellules RCC4 plus pVHL

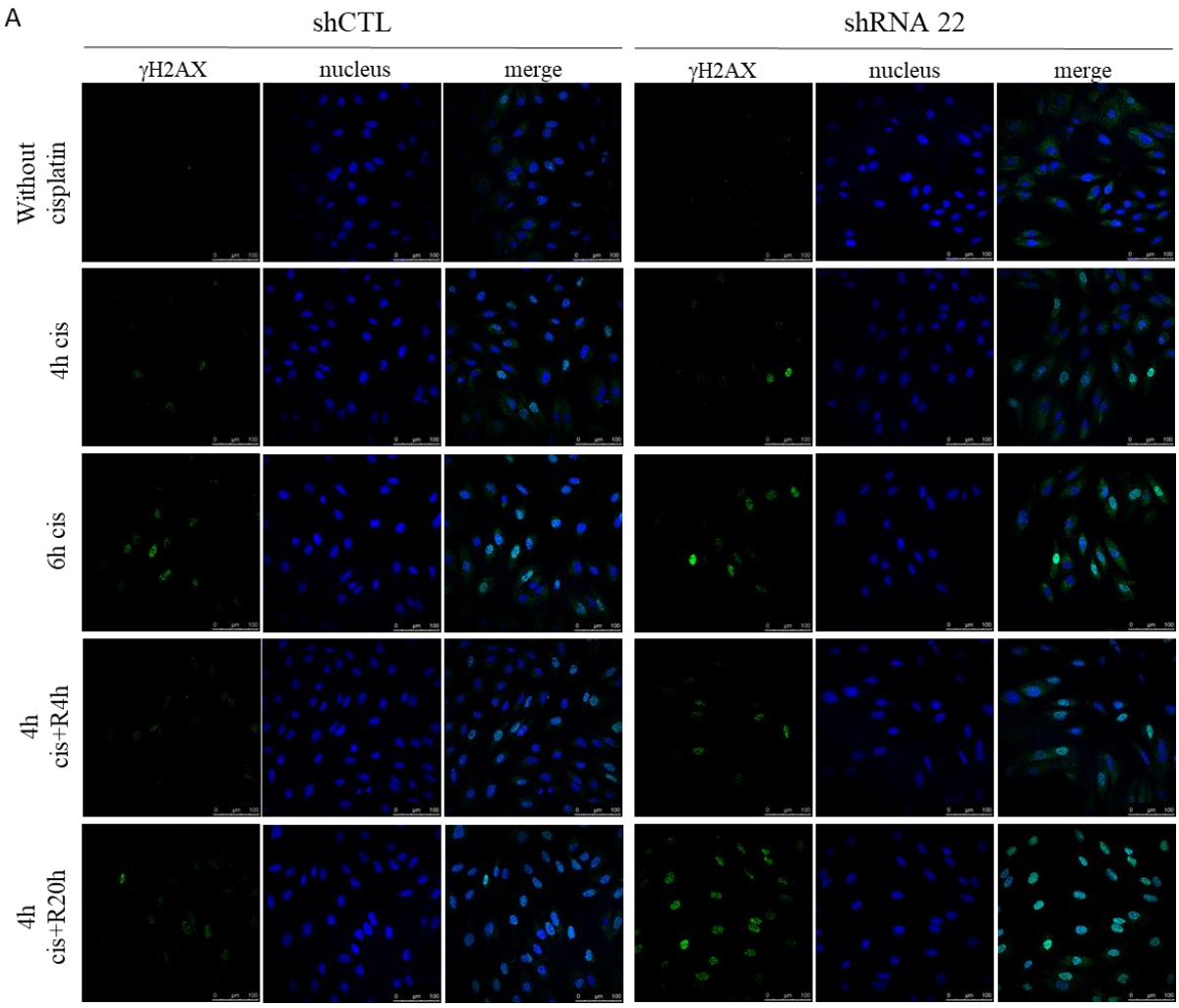
Les cellules RCC4 plus pVHL ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de 20 μM de cisplatine durant 48h en condition de normoxie. Après incubation, les protéines ont été extraites puis (A) le profil de phosphorylation des protéines cibles d'ATM et ATR, (B) l'abondance de la protéine EYA3 et (C) l'abondance de la protéine γH2AX ont été analysés par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (D) Les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de 20 μM de cisplatine durant différents timings et le clivage de PARP et l'abondance de la protéine γH2AX ont été analysés par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge (n=1). N : normoxie ; NC : normoxie plus cisplatine. *** $p<0,001$.

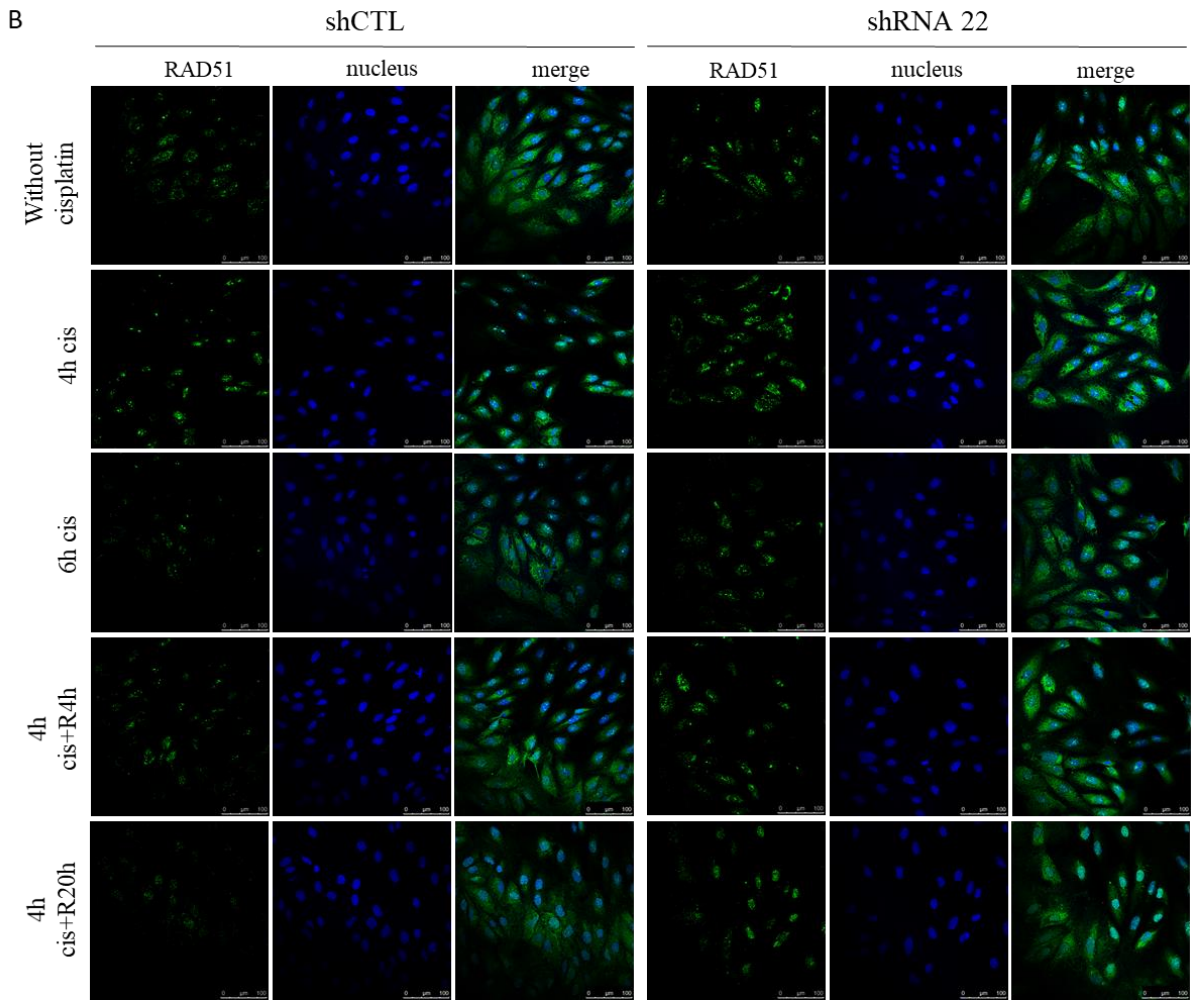
24h soit due en partie à un défaut de réparation des dommages à l'ADN par la protéine RAD51 mais que ça ne soit plus le cas lorsque les cellules sont exposées au cisplatine durant 48h. Ainsi, l'augmentation de la chimiosensibilité des cellules invalidées pour TMEM45A exposées au cisplatine durant 48h proviendrait d'une augmentation de l'activation de la voie UPR et non à un défaut du recrutement de la protéine RAD51. Afin de confirmer ces résultats, il est nécessaire d'analyser le recrutement de la protéine RAD51 par immunofluorescence dans des cellules exposées au cisplatine durant 48h. De plus, il est possible qu'une autre voie de réparation des dommages à l'ADN soit impliquée, il serait alors intéressant d'étudier d'autres voies de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN lors d'expositions courtes et longues au cisplatine.

3.4 Impact de l'invalidation de TMEM45A sur les dommages à l'ADN induit par le cisplatine dans les cellules RCC4 plus pVHL

Les cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A présentent une résistance face à la mort cellulaire induite par le cisplatine. Sachant que le cisplatine induit des dommages à l'ADN, nous avons étudié de façon similaire à la lignée SQD9, l'induction des dommages à l'ADN induit par le cisplatine. Pour cela, les cellules RCC4 plus pVHL contrôles et invalidées pour TMEM45A ont été incubées en présence de 20 µM de cisplatine durant 48h. Suite à cette incubation, les protéines ont été extraites et nous avons étudié trois facteurs : le profil de phosphorylation des cibles des protéines ATM/ATR en réponse aux dommages à l'ADN, le niveau d'expression de la protéine γH2AX qui est un marqueur des dommages à l'ADN et le niveau d'expression de la protéine EYA3 impliquée dans la déphosphorylation de γH2AX pour permettre le recrutement des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN.

Suite à l'exposition au cisplatine, une augmentation de la phosphorylation des protéines cibles de ATM/ATR est observée dans les cellules RCC4 plus pVHL contrôles et invalidées pour TMEM45A, signifiant la présence et la détection de dommages à l'ADN induits par le cisplatine. Une légère diminution de la phosphorylation de ces cibles est observée entre les cellules invalidées et les cellules contrôles (figure R26A). De même, l'abondance de γH2AX augmente suite à une exposition au cisplatine et cette abondance diminue dans les cellules invalidées pour TMEM45A (figure R26B). Ces résultats suggèrent une diminution des dommages à l'ADN dans les cellules invalidées pour TMEM45A. Cependant à ce stade, nous ne pouvons pas préciser si cette différence provient d'une diminution de l'induction des dommages à l'ADN, une augmentation de la réparation des dommages à l'ADN, ou d'une diminution de l'induction de l'apoptose en réponse à ces dommages. En effet, lorsqu'une cellule entre en apoptose, son ADN est fragmenté entrainant également le recrutement de γH2AX aux points de cassure. Ainsi la détection de γH2AX observée ici peut être due soit aux dommages à


A
shCTL
shRNA 22
γH2AX
nucleus
merge
γH2AX
nucleus
merge
Without cisplatin
4h cis
6h cis
4h cis+R4h
4h cis+R20h



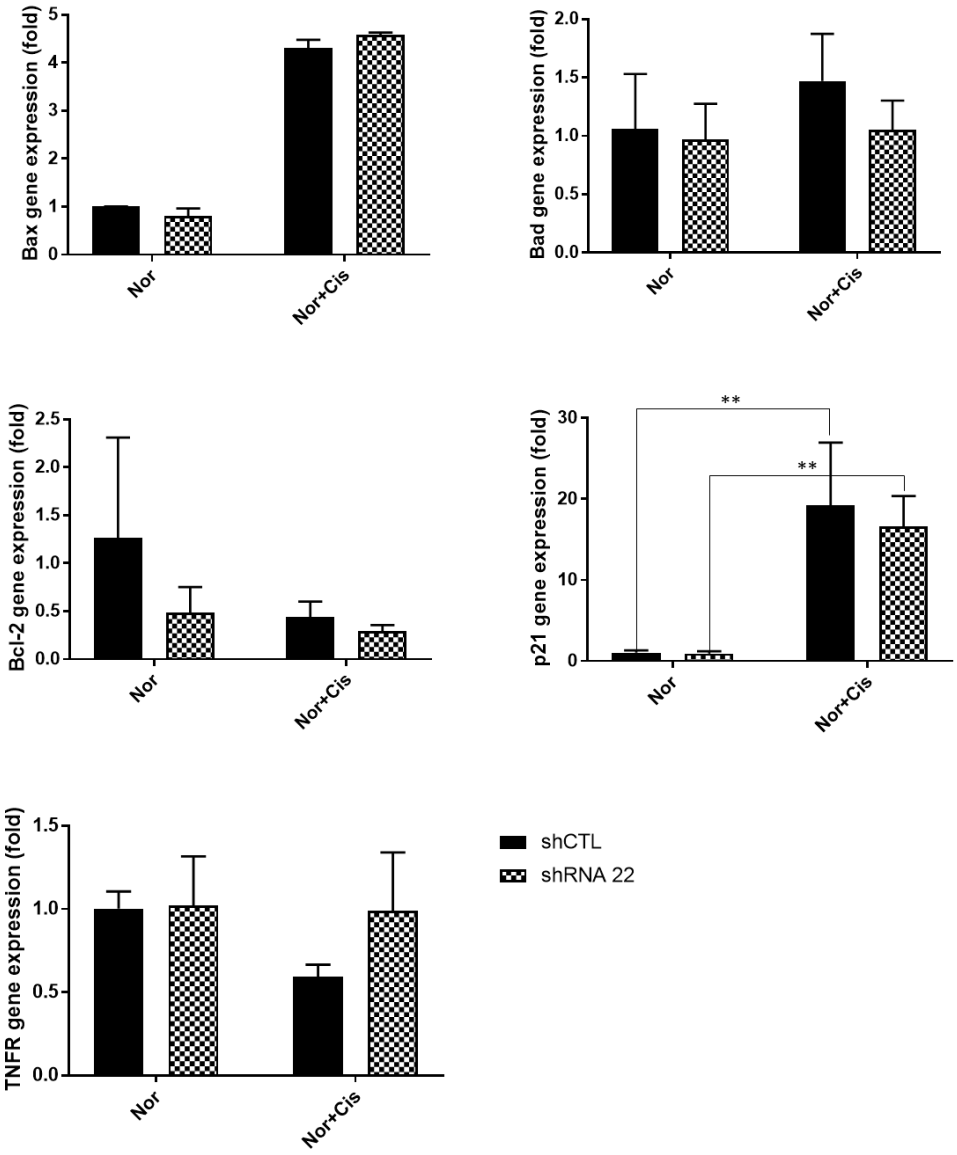
<u>Figure R27</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur la réparation des dommages à l'ADN dans les cellules RCC4 plus pVHL

Les cellules RCC4 plus pVHL ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de 20 µM de cisplatine durant 4h et 6h. Après 4h d'incubation, le milieu contenant le cisplatine est retiré et les cellules sont incubées dans du milieu frais sans cisplatine durant 4h et 20h. Après incubation (A) l'abondance de la protéine γH2AX et (B) la localisation de la protéine RAD51 ont été étudiées par immunofluorescence. Les images ont été prises avec un microscope confocal (n=1).

l'ADN induits par le cisplatine, soit à la fragmentation de l'ADN survenant lors de l'apoptose. Dans le cas de la protéine EYA3, une diminution de l'abondance non significative a été observée dans les cellules invalidées pour TMEM45A en comparaison aux cellules contrôles (figure R26C).

Afin de déterminer si la résistance des cellules RCC4 plus pVHL provient d'une modulation de l'induction ou de la réparation des dommages à l'ADN, nous avons effectué des expériences de cinétiques similaires à celles réalisées pour les cellules SQD9. En effet, l'abondance de γH2AX et le clivage de PARP ont été étudiés après une exposition des cellules RCC4 plus pVHL à 20 μM de cisplatine durant 15 minutes, 30 minutes, 1h, 2h, 4h et 48h. L'abondance de γH2AX augmente de façon importante après une exposition au cisplatine de 4h et 48h. Cette augmentation d'abondance est associée à une augmentation du clivage de PARP. Ces résultats montrent une induction de l'apoptose après une exposition au cisplatine de 4h et 48h, suggérant qu'une partie de l'augmentation de l'abondance de γH2AX provient de la fragmentation de l'ADN survenant lors de l'apoptose. A ces timings, dans les cellules invalidées pour TMEM45A, l'abondance de γH2AX et du clivage de PARP diminue comparée à celle observée dans les cellules contrôles, reflétant la résistance des cellules invalidées pour TMEM45A à la mort cellulaire induite par le cisplatine. A de plus faible temps d'exposition, aucune différence n'a été observée entre les cellules invalidées pour TMEM45A et les cellules contrôles (figure R26D). Ces résultats suggèrent que l'invalidation de TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL n'a pas d'effet sur l'induction ou la détection des dommages à l'ADN, ainsi la résistance au cisplatine observée dans les cellules invalidées peut provenir d'une augmentation des réparations des dommages à l'ADN ou à la diminution de l'induction de la mort cellulaire par apoptose.

Afin d'évaluer la voie de réparation des cassures double-brin, nous avons ensuite étudié le recrutement d'une des protéines essentielles à la réparation des dommages à l'ADN, RAD51. Les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en présence de 20 μM de cisplatine durant 4h et 6h, puis après 4h d'exposition à la drogue, le milieu contenant le cisplatine a été remplacé par du milieu frais durant 4h et 24h. L'abondance de γH2AX et le recrutement de RAD51 ont été étudiés par immunofluorescence. L'abondance de γH2AX augmente suite à une exposition au cisplatine et cette abondance augmente avec la durée du traitement. Dans les cellules RCC4 plus pVHL contrôles, le marquage de γH2AX diminue après 4h et 24h de temps de récupération, signifiant que les cellules ont réparé les dommages à l'ADN induit par le cisplatine. De façon surprenante, les dommages à l'ADN persistent dans les cellules invalidées pour TMEM45A. En parallèle, nous avons étudié le recrutement de RAD51, protéine recrutée aux points de cassure afin de permettre leur réparation. Le marquage obtenu est très différent de celui observé dans les cellules SQD9. En effet, nous observons un marquage cytoplasmique de RAD51 dans les cellules, et ce pour chaque condition expérimentale, même en absence de dommages à l'ADN. La localisation de



<u>Figure R28</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'expression de protéines pro et anti apoptotiques dans les cellules RCC4 plus pVHL

Les cellules RCC4 plus pVHL ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de 20 µM de cisplatine durant 48h en condition de normoxie. Après incubation, les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression des ARNm des gènes *Bax*, *Bad* et *Bak*, *Bcl-2*, *p21 et TNFR* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). Nor : normoxie ; Nor+Cis : normoxie plus cisplatine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test anova type 2 suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey (** $p<0,01$).

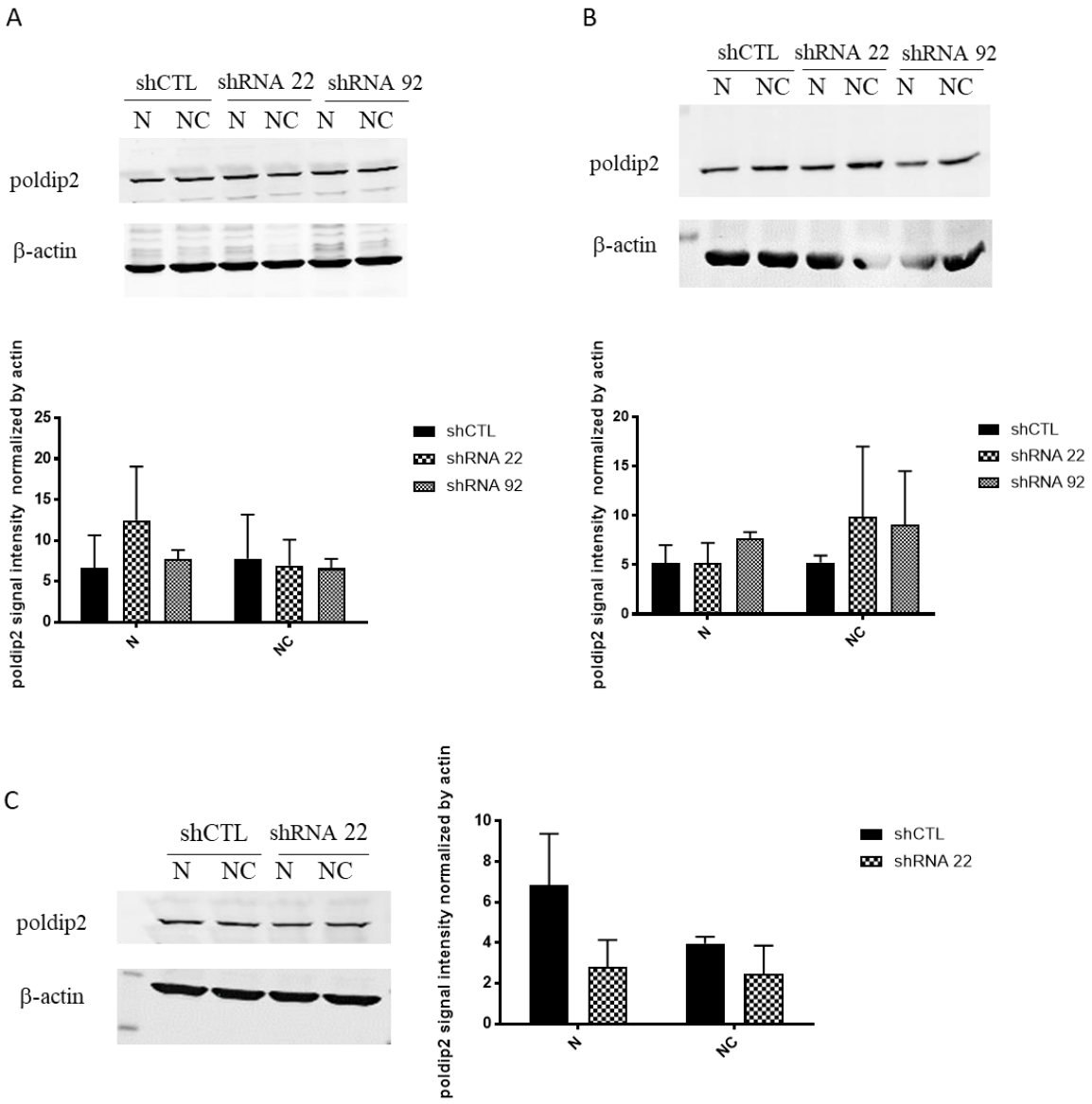
la protéine semble cependant devenir nucléaire suite à une exposition au cisplatine. L'abondance de la protéine étant importante même en absence de cisplatine, il est difficile de conclure quant au recrutement de RAD51 aux points de cassure induits par le cisplatine dans les cellules RCC4 plus pVHL (figure R27). Ces résultats signifient que la diminution des dommages à l'ADN observée ne provient probablement pas de la modification de la déphosphorylation de γH2AX. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres voies de réparation des dommages à l'ADN.

Le niveau d'expression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et p21 mais également pro-apoptotiques telles que Bax, Bad et Bak a été étudié. De plus la voie extrinsèque de l'apoptose a également été investiguée via le niveau d'expression du récepteur de mort cellulaire TNFR. Pour cela, les cellules RCC4 plus pVHL contrôles et invalidées pour TMEM45A ont été incubées en présence de 20 μM de cisplatine durant 48h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après extraction d'ARN, le niveau d'expression des gènes cités a été analysé par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence.

Comme le montre la figure R28, une exposition des cellules RCC4 au cisplatine entraine une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de Bax, protéine pro-apoptotique. Ces résultats indiquent que la mort cellulaire induite dans la lignée RCC4 plus pVHL par le cisplatine pourrait faire intervenir la protéine Bax. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les cellules invalidées et les cellules contrôles. De plus, une exposition au cisplatine entraine une augmentation de l'expression de l'ARNm de p21 suggérant un arrêt du cycle cellulaire par le cisplatine. A nouveau, aucune différence n'a été observée entre les cellules invalidées pour TMEM45A et les cellules contrôles. Contrairement à la protéine Bax, aucune modulation de l'expression de Bad n'a été relevée en présence de cisplatine. Dans le cas de Bak, aucune amplification n'a été observée, signe d'une absence d'expression de ce transcrit. Le niveau d'expression de Bcl-2 semble diminuer suite à une incubation des cellules cancéreuses en présence de cisplatine, cependant le faible niveau d'expression de ce transcrit entraine une grande variabilité du signal entre les réplicats, ce qui ne permet pas d'interpréter les résultats.

Pour finir, le niveau d'expression du récepteur de mort TNFR a également été étudié. Alors qu'une diminution de son expression est détectée dans les cellules contrôles en présence de cisplatine, aucun changement n'est observé dans les cellules invalidées pour TMEM45A. Sachant que TNFR est un médiateur de l'apoptose, que ce récepteur n'a jamais été impliqué dans le développement de résistance à la mort cellulaire et que les cellules invalidées pour TMEM45A sont résistantes au cisplatine, ce résultat est surprenant.

L'ensemble de ces résultats indique qu'une exposition des cellules RCC4 au cisplatine entraine une augmentation du niveau d'expression des gènes p21 et Bax. Cependant, aucune



<u>Figure R29</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'expression de poldip2

(A) et (B) Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). (A) Après transduction, les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 100 µM de cisplatine durant 24h en normoxie. Après incubation, l'abondance de la protéine poldip2 a été analysée par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (B) Après transduction, les cellules SQD9 ont été incubées en absence ou en présence de 20 µM de cisplatine durant 48h en normoxie. Après incubation, l'abondance de la protéine poldip2 a été analysée par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3). (C) Les cellules RCC4 plus pVHL ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules RCC4 plus pVHL ont été incubées en absence ou en présence de 20 µM de cisplatine durant 48h en normoxie. Après incubation, l'abondance de la protéine poldip2 a été analysée par western blot. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=3).

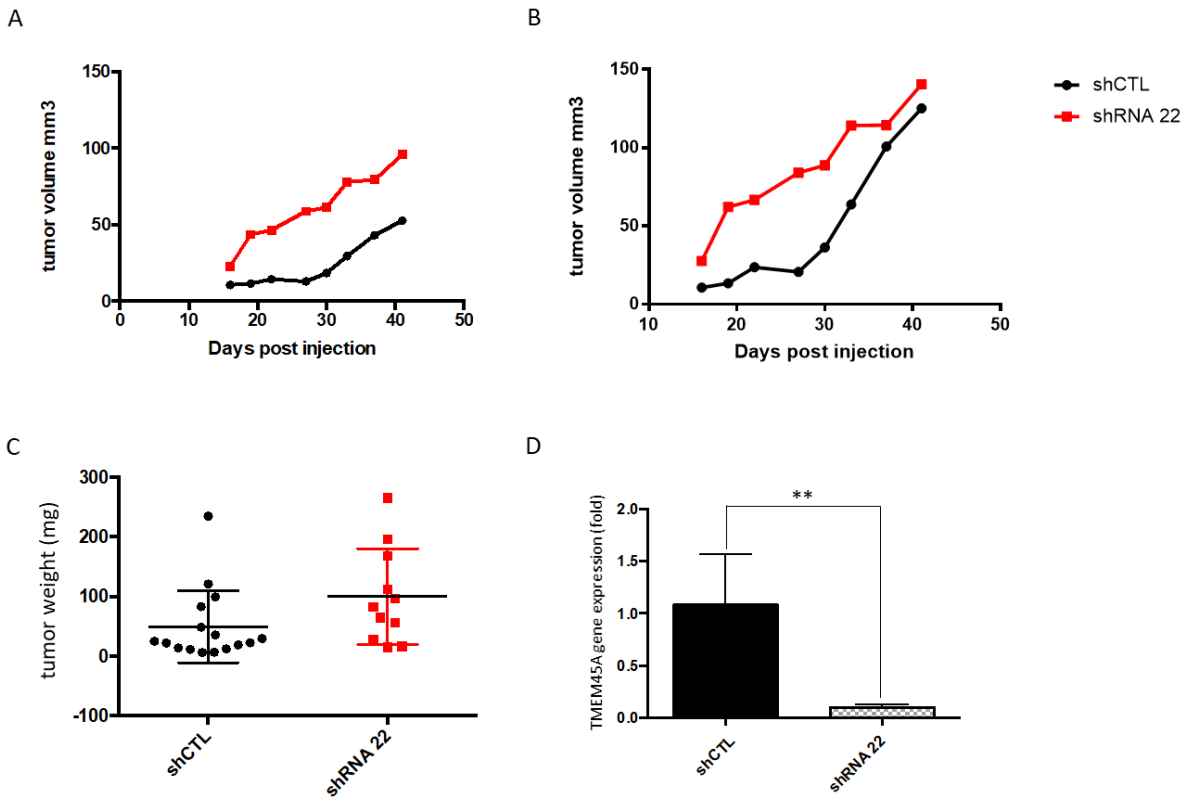
modification n'a été observée entre les cellules contrôles et les cellules invalidées. Dès lors, nous pouvons conclure que la résistance à la mort cellulaire induite par le cisplatine dans les cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A ne provient pas d'une modulation de l'expression de gènes codant pour des protéines pro ou anti-apoptotiques.

3.5 Impact de l'invalidation de TMEM45A sur l'expression de poldip2

L'étude transcriptomique des cellules SQD9 contrôles et invalidées pour TMEM45A par analyse RNAseq a permis de mettre en évidence des modifications du niveau d'expression de nombreux gènes pouvant être impliqués dans les altérations phénotypiques observées dans les cellules invalidées pour TMEM45A. C'est le cas du gène *poldip2* dont l'expression est diminuée dans le cellules invalidées par rapport aux cellules contrôles. Le gène *poldip2* code pour une protéine qui a été impliquée dans de nombreux processus. En effet, poldip2 interagirait avec la polymérase PrimPol et augmenterait son activité (Guilliam, Bailey et al. 2016). Cette interaction pourrait avoir un impact sur la prolifération cellulaire, mais également la tolérance des dommages à l'ADN. De plus, cette protéine a été récemment impliquée dans la croissance tumorale et l'invasion du cancer du poumon (Chen, Kuo et al. 2018). La protéine poldip2, protéine senseur de l'oxygène, interviendrait dans l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses en hypoxie (Paredes, Sheldon et al. 2018, Paredes, Suster et al. 2018). L'ensemble de ces données fait de poldip2 un bon candidat pour de plus amples analyses. Cependant, la diminution d'expression du gène codant pour la protéine poldip2 n'a pu être validée au niveau protéique que dans le modèle RCC4 plus pVHL (figure R29). Nous n'avons donc pas poursuivi l'étude de ce gène.

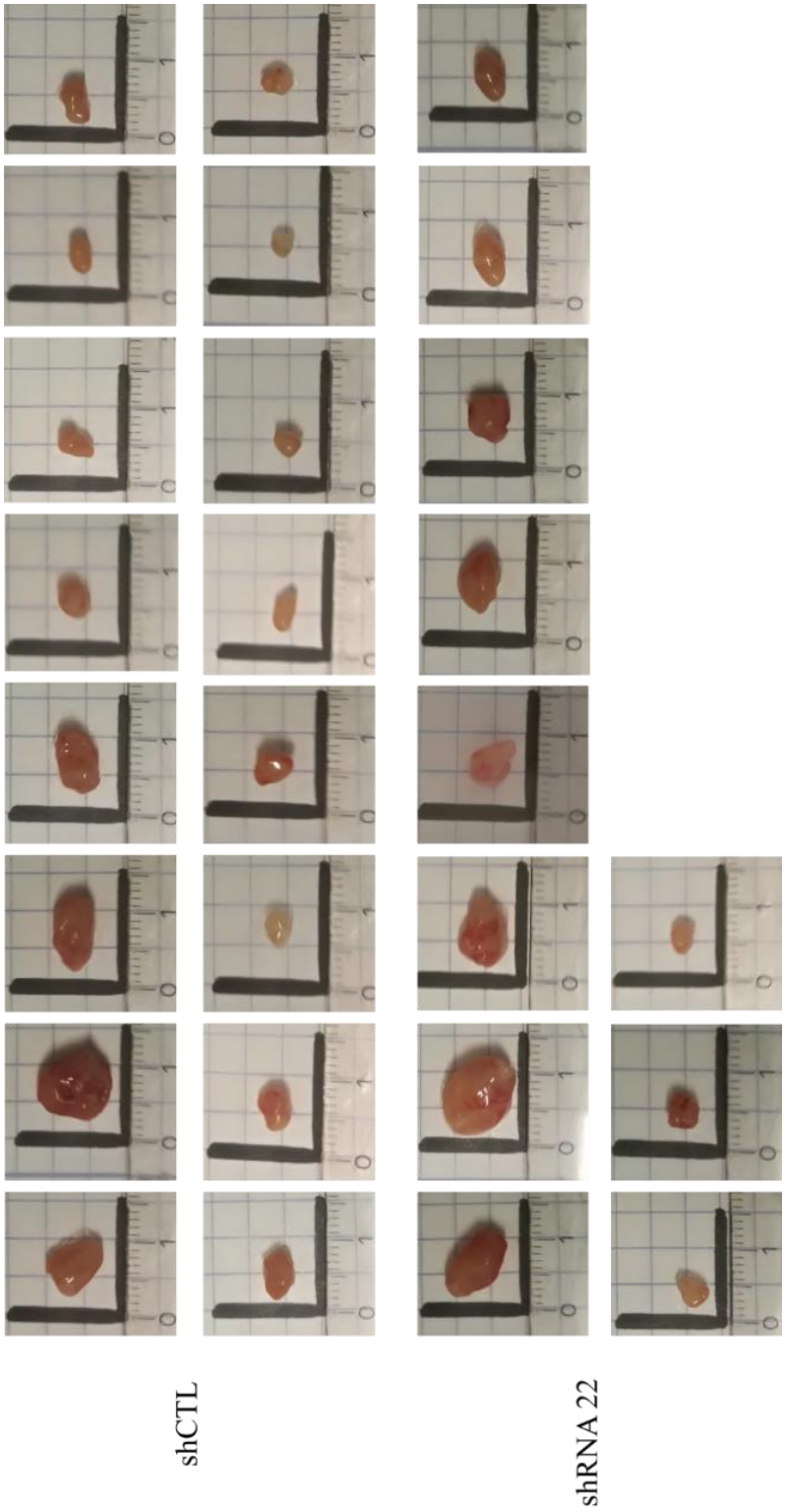
Conclusion

In vitro, l'absence d'expression de la protéine TMEM45A impacte la prolifération cellulaire, mais également la chimiosensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine. Cependant, ces effets semblent être différents suivant le modèle cellulaire étudié. En effet, alors que l'invalidation de TMEM45A n'a aucun effet sur les cellules CAL27, la diminution du niveau d'expression de cette protéine provoque un ralentissement de la prolifération cellulaire et une modulation de la chimiosensibilité des cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL. De plus, suivant le type de cancer ciblé, TMEM45A semble avoir un double rôle sur la sensibilité au cisplatine, exerçant un rôle chimiosensibilisant dans les cellules RCC4 plus pVHL mais, au contraire, un rôle chimioprotecteur dans les cellules SQD9. TMEM45A interviendrait dans la sensibilité au cisplatine via le recrutement de la protéine RAD51 aux points de cassure et/ou par une modulation de l'activation de la voie UPR. Au vu de ces résultats, nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de l'invalidation de TMEM45A *in vivo*.



<u>Figure R30</u> : Impact de l'invalidation de TMEM45A sur la croissance tumorale *in vivo*

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été resuspendues dans une solution de PBS et Matrigel puis implantées en sous-cutané dans des souris Nude. (A) et (B) Durant 42 jours, les masses tumorales ont été mesurées et ainsi le volume tumoral a été calculé (n=2). Le graphique (A) reprend l'ensemble des groupes de souris alors que le graphique (B) représente les souris dont la masse tumorale ne s'est pas développée. (C) Après exérèse de la tumeur, le poids des masses a été mesuré (n=16 pour le groupe shCTL et n=12 pour le groupe shRNA 22). (D) Après exérèse, les ARN totaux ont été extraits et le niveau d'expression de l'ARNm du gène *TMEM45A* a été quantifié par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne ± SD (n=6). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un t test non paire (**p<0,01).



<u>Figure R31</u> : Xenogreffe des cellules SQD9 contrôles et invalidées pour TMEM45

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été resuspendues dans une solution de PBS et Matrigel puis implantées en sous-cutané dans des souris Nude. Après 42 jours, les masses tumorales ont été extraites et photographiées.

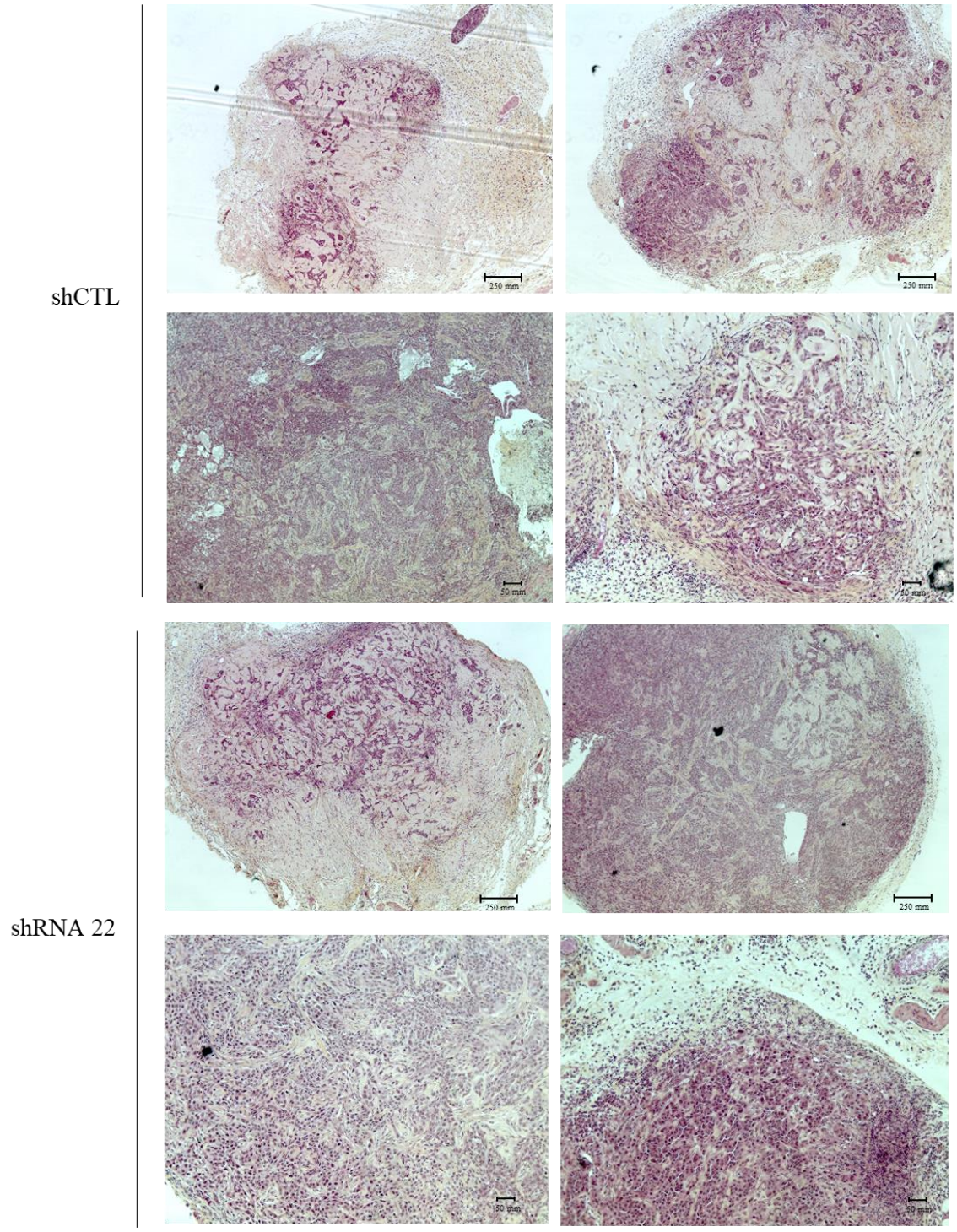
Chapitre 3 : Etude du rôle de la protéine TMEM45A in vivo

1. Rôle de la protéine TMEM45A sur la croissance tumorale in vivo

Les expériences d'invalidation de la protéine TMEM45A ont mis en évidence un ralentissement de la prolifération des cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A par rapport aux cellules contrôles. Nous nous sommes donc demandé si l'absence d'expression de TMEM45A pourrait avoir un impact sur la croissance tumorale *in vivo*. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des xénogreffes de tumeur à partir de la lignée cellulaire SQD9 humaine chez des souris Nude. En effet, nous avons implanté des cellules SQD9 transduites avec le shARN contrôle ou des cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A en sous-cutané sur le flanc de souris Nude.

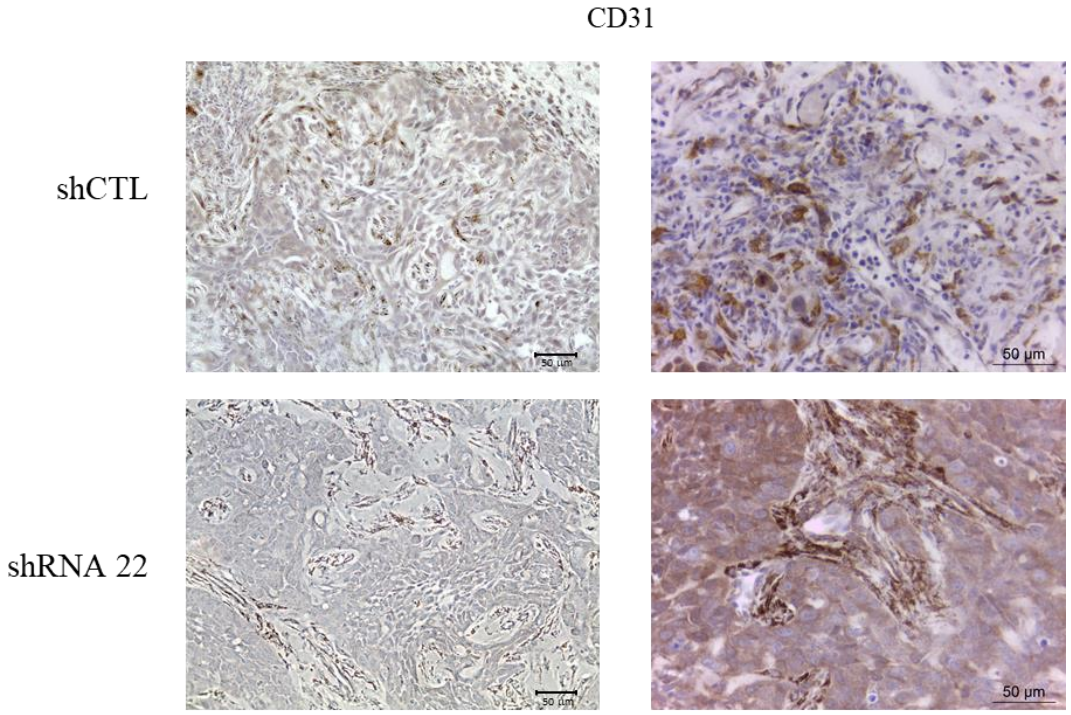
Notre hypothèse de départ était que la croissance des tumeurs formées à partir des cellules invalidées pour TMEM45A serait diminuée par rapport à la croissance des tumeurs contrôles. Deux paramètres ont alors été étudiés : le temps de formation des tumeurs et la taille des tumeurs. Le projet a été réalisé deux fois de façon indépendante et, dans les deux cas, nous avons observé de façon inattendue une augmentation de la croissance tumorale dans le cas des tumeurs invalidées pour TMEM45A en comparaison aux tumeurs contrôles (figures R30A). Sachant qu'une masse est qualifiée de tumeur à partir de 50 mm^3, nous avons calculé l'incidence des tumeurs pour chacun des groupes. Ainsi nous avons observé seulement 25% des souris du groupe contrôle contre 70% des souris xénogreffées avec des cellules invalidées pour TMEM45A présentant une masse tumorale. Si les souris ne présentant pas de tumeurs sont écartées de l'analyse, nous pouvons remarquer que les tumeurs contrôles et les tumeurs invalidées arrivent à un volume tumoral semblable à la fin de l'expérience (figures R30B). Au vu de ces résultats, après exérèse des masses tumorales, nous avons extrait les ARN totaux des tumeurs puis nous avons analysé le niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A dans les différents groupes par RT-qPCR en utilisant *23 kDa* comme gène de référence. Les résultats montrent bien une invalidation du niveau d'expression de TMEM45A dans les tumeurs invalidées en comparaison aux tumeurs contrôles (figure R30D). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'absence de TMEM45A a un impact sur l'initiation de la prise tumorale et la croissance tumorale dans les premiers jours qui suivent la xénogreffe.

Lors de la seconde expérience, après exérèse des masses tumorales, chaque tumeur a été pesée et photographiée. Les tumeurs invalidées pour TMEM45A présentaient une masse légèrement plus élevée que les tumeurs contrôles (figure R30C). De plus, sur l'ensemble du groupe, les tumeurs contrôles étaient majoritairement plus petites que les tumeurs invalidées pour TMEM45A (figure R31).

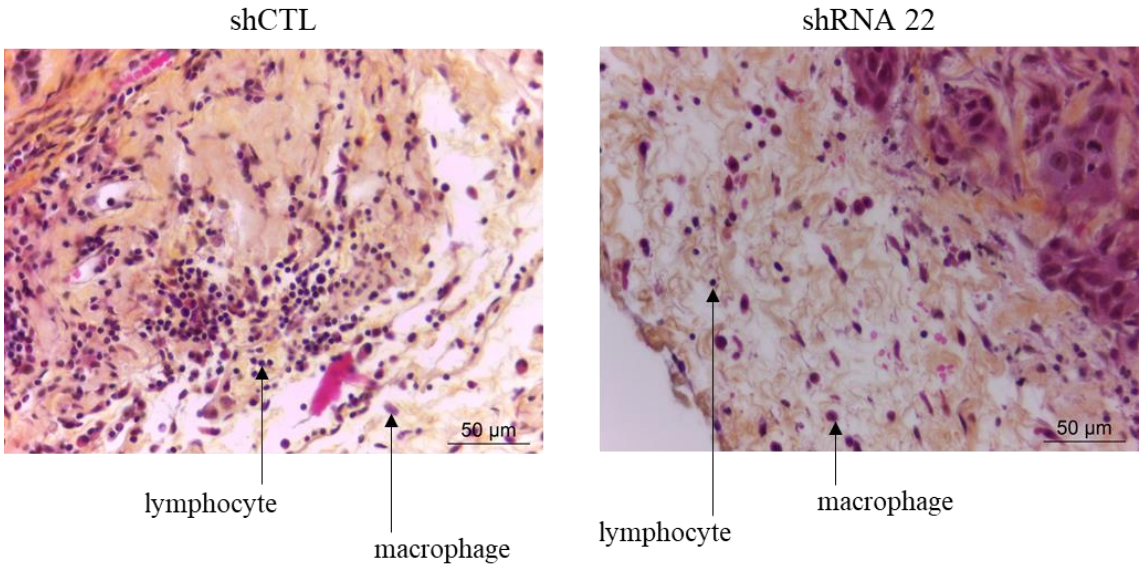


<u>Figure R32</u> : Coloration HES des coupes histologiques des tumeurs contrôles et invalidées pour TMEM45A

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été resuspendues dans une solution de PBS et Matrigel puis implantées en sous cutané chez des souris Nude. Après exérèse des masses tumorales, des coupes histologiques de tissu en paraffine ont été réalisées puis marquées à l'Hémalun Eosine safran, marquage HES.



<u>Figure R33</u> : Immunomarquage des cellules endothéliales
Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été resuspendues dans une solution de PBS et Matrigel puis implantées en sous-cutané dans des souris Nude. Après exérèse des masses tumorales, des coupes histologiques de tissu en paraffine ont été réalisées puis la protéine CD31 a été détectée par un anticorps couplé à la péroxydase. Après ajout d'un substrat, le produit issu de l'activité enzymatique de la peroxydase est révélé par un chromogène entrainant une coloration brune au niveau du site de fixation de l'anticorps visible par microscopie optique.



<u>Figure R34</u> : Visualisation de l'infiltrat immunitaire par marquage HES

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été resuspendues dans une solution de PBS et Matrigel puis implantées en sous-cutané dans des souris Nude. Après exérèse des masses tumorales, des coupes histologiques de tissu en paraffine ont été réalisées puis marquées à l'Hémalun Eosine Safran (marquage HES).

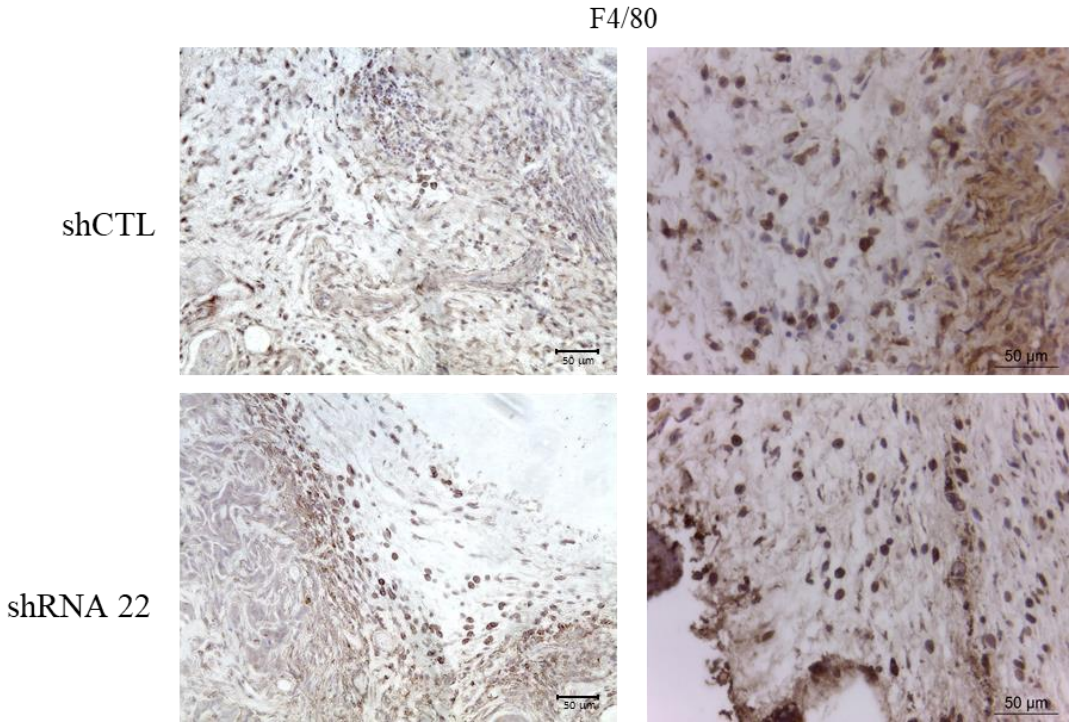
2. Etude histologique des tumeurs

Afin de comprendre les résultats obtenus précédemment, nous avons, après exérèse des tumeurs, séparé les masses en deux parties : une pour l'extraction d'ARN et la seconde pour des analyses histologiques.

Nous avons dans un premier temps réalisé des colorations hémalun érythroposine safran (HES) des tumeurs contrôles et invalidées pour TMEM45A. Cette coloration est une coloration trichromatique obtenue par l'ajout d'une étape de coloration avec le safran permettant de colorer les fibres de collagène des tissus conjonctifs en jaune. Les résultats obtenus montrent une différence de densité des cellules cancéreuses entre les tumeurs contrôles et les tumeurs invalidées, mais également au sein d'un même groupe. Cependant, nous pouvons remarquer que la majorité des tumeurs contrôles présentent une faible densité en cellules cancéreuses par rapport aux cellules stromales avec un environnement enrichie en collagène. Au contraire, les tumeurs invalidées présentent quant à elles une grande densité en cellules cancéreuses (figure R32). Le collagène présent sur les coupes peut soit provenir du microenvironnement tumoral soit provenir de la solution de matrigel utilisée pour promouvoir l'initiation tumorale. Dans le deuxième cas, il est alors possible que le collagène du matrigel ait été moins dégradé par les cellules SQD9 contrôles par rapport aux cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A. A ce stade, les expériences réalisées ne permettent pas de conclure sur ce point.

Nous avons ensuite exploré deux hypothèses pouvant expliquer la différence de croissance tumorale observée. La première était qu'une modulation de la vascularisation de la tumeur pouvait entrainer une variation de la croissance tumorale. Pour cela nous avons effectué un immunomarquage de la protéine CD31, marqueur de cellules endothéliales. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les tumeurs contrôles et les tumeurs invalidées (figure R33).

La seconde hypothèse était qu'une modification du recrutement des cellules immunitaires au site tumoral pouvait influencer la croissance des tumeurs. Les souris Nude sont caractérisées par l'absence de lymphocytes T. Cependant, ces souris possèdent des lymphocytes B, des macrophages, mais également des cellules NK. Nous avons donc analysé la présence de macrophages au niveau des tumeurs contrôles et des tumeurs invalidées. Après coloration HES, nous avons remarqué à la périphérie des tumeurs la présence de lymphocytes et de macrophages (figure R34). La proportion de ces deux populations de cellules varie entre les tumeurs contrôles et les tumeurs invalidées. En effet, alors que les macrophages sont visibles dans les tumeurs contrôles et les tumeurs invalidées, les lymphocytes se retrouvent principalement dans les tumeurs contrôles par rapport aux tumeurs invalidées. Il est donc possible que cette différence d'abondance des lymphocytes à la périphérie des tumeurs ait un impact sur la croissance tumorale. Cependant, les cellules cancéreuses sont ciblées par les lymphocytes T, absents de l'organisme des souris Nude, et non par les lymphocytes B. Il serait donc



<u>Figure R35</u> : Immunomarquage des macrophages

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales exprimant un shARN contrôle (shCTL) ou un shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shRNA 22). Après transduction, les cellules SQD9 ont été resuspendues dans une solution de PBS et Matrigel puis implantées en sous-cutané dans des souris Nude. Après exérèse des masses tumorales, des coupes histologiques de tissu en paraffine ont été réalisées puis la protéine F4/80 a été détectée par un anticorps couplé à la péroxydase. Après ajout d'un substrat, le produit issu de l'activité enzymatique de la peroxydase est révélé par un chromogène entrainant une coloration brune au niveau du site de fixation de l'anticorps visible par microscopie optique.

intéressant de réaliser un marquage permettant d'identifier plus précisément les lymphocytes présents dans les tumeurs.

Afin de valider la présence de macrophage dans les tumeurs, nous avons réalisé un marquage de la protéine F4/80 marqueur des macrophages murins. Les résultats confirment la présence de macrophages au sein des tumeurs contrôles et invalidées pour TMEM45A. Aucune différence n'a été observée quant à l'abondance de ces cellules au sein des tumeurs (figure R35). Il faut cependant garder à l'esprit que la différenciation des macrophages en phénotype M1 ou M2 peut induire un effet anti- ou pro-tumoral. Il serait donc intéressant de réaliser un marquage spécifique des macrophages M1 et M2 afin d'identifier quel type de macrophages se retrouve au sein de ces tumeurs.

Conclusion

L'invalidation de l'expression de TMEM45A entraine une augmentation de la croissance tumorale *in vivo*. Il semblerait que la composition du microenvironnement tumoral, et en particulier l'infiltrat immunitaire, soient différents dans les tumeurs invalidées par rapport aux tumeurs contrôles. Ces observations pourraient expliquer l'augmentation de la croissance tumorale des tumeurs invalidées pour TMEM45A en comparaison aux tumeurs contrôles. Cependant, des analyses plus détaillées sont nécessaires afin de conclure sur la cause de cette augmentation de croissance tumorale. De plus, il serait intéressant d'étudier la réponse au cisplatine de ces tumeurs contrôles et invalidées pour TMEM45A.

Chapitre 4 : Matériel et méthodes complémentaires

Nous décrivons dans cette partie les expériences présentées dans les résultats qui ne sont pas déjà présentées dans le matériel et méthodes de l'article cité dans la partie 2 des résultats.

Table R1 : Liste des anticorps utilisés en western blot

Protein	Primary antibody	Secondary antibody
Western blot		
Poldip2	Anti-poldip2 (Rabbit, Abcam, ab181841, 1/1000)	IRDye 800CW (Anti-rabbit, Li-Cor Biosciences 926-32211, 1/10000)
LC3	Anti-LC3 (Mouse, Nanotools, 0260-100/LC3-2G6, 1/1000)	IRDye 680RD (Anti-mouse, Li-Cor Biosciences 926-68070, 1/10000)
P62	Anti-p62 (Mouse, BD Pharmingen 610832, 1/1000)	IRDye 680RD (Anti-mouse, Li-Cor Biosciences 926-68070, 1/10000)
BNIP3	Anti-BNIP3 (Mouse, Abcam, ab10433, 1/1000)	IRDye 680RD (Anti-mouse, Li-Cor Biosciences 926-68070, 1/10000
Histologic analysis		
CD31	Anti-CD31 (Rabbit, Abcam, ab28364, 1/50)	Anti rabbit IgG Vectastain RK4001
F4/80	Anti-F4/80 (Rat, Abcam, ab16911, 1/50)	Anti Rat IgG GE Healthcare NA935V

Table R2 : Liste des amorces utilisées en qPCR

Genes	Firm	Forward primer	Reverse primer
BNIP3	Integrated DNA Technologies	TTTGCTGGCCATCGGATT	ACCAAGTCAGACTCCAGTTCTTCA
CAIX	Integrated DNA Technologies	GAGGCCTGGCCGTGTTG	AACTGCTCATAGGCACTGTTTTCTT
Bak	Integrated DNA Technologies	CTTCGTGGTCGACTTCATGCT	GGACCATTGCCCAAGTTCAG
Bax	Integrated DNA Technologies	TGTCGCCCTTTTCTACTTTGC	GTCCAGCCCATGATGGTTCT
Bad	Integrated DNA Technologies	AGGATGAGTGACGAGTTTGTGGA	GGAGCTTTGCCGCATCTG
Bcl-2	Integrated DNA Technologies	CACAGGAGAATGGATAAGGCAAA	CATCCAGCCAGATTTAGGTTCAA
P21	Integrated DNA Technologies	CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA	CCAGGACTGCAGGCTTCCT
TNFR	Integrated DNA Technologies	AATAATTCGATTTGCTGTACCAAGTG	GAGGCAGTGTCTGAGGTGGTTT

Détermination de la concentration en glucose et lactate dans les milieux de culture des cellules SQD9

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales (Sigma) exprimant un shARN contrôle ou un shARN ciblant TMEM45A puis les cellules ont été incubées en absence ou en présence de 100 µM de cisplatine durant 24h en condition de normoxie et d'hypoxie. Après incubation, les milieux de cultures ont été récupérés afin de déterminer les concentrations en glucose et en lactate tel que décrit par Porporato et al (Porporato, Payen et al. 2012). Les différents milieux ont été passés dans des tubes d'ultracentrifugation dotés de filtre avec un cut-off de 10 kDa (VWR) afin d'éliminer les protéines présentes. Puis les concentrations en glucose et lactate ont été mesurées un utilisant l'analyseur enzymatique CMA600 (Aurora Borealis), en suivant les recommandations du fabricant. Les valeurs de concentration en glucose et lactate ont été normalisées par la concentration en protéines des cellules des puits correspondants obtenue par dosage de Pierce.

Etude du potentiel de membrane mitochondrial par cytométrie en flux

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales (Sigma) exprimant un shARN contrôle ou un shARN ciblant TMEM45A. Après transduction, les cellules ont été ensemencées en T25 à raison de 1 000 000 de cellules par boite de culture durant 24h en normoxie. Après incubation, les cellules ont été incubées 30 minutes à 37°C en présence de 25 nM de TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester, Molecular Probes, Life Technologies). Les cellules sont ensuites rincées au PBS et trypsinisées en utilisant de la trypsine EDTA (Gibco, Life Technologies) avant d'être centrifugées 5 minutes à 1000 rpm et resuspendues dans du PBS sur glace. Les cellules sont alors analysées en cytométrie en flux en utilisant le FACSverse (BD Biosciences).

Marquage des cellules SQD9 à l'Oil Red O

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales (Sigma) exprimant un shARN contrôle ou un shARN ciblant TMEM45A. Après transduction, les cellules ont été ensemencées en plaque 6 puits à raison de 150 000 cellules par puits durant 24h en condition de normoxie. Le milieu de culture est décanté puis les cellules sont fixées durant 5 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % avant d'être rincées deux fois au PBS. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes en présence de 800 µL d'une solution 0,2 % d'ORO (Merck) dans de l'isopropanol. La solution d'ORO est ensuite décantée puis les cellules sont rincées trois fois au PBS. Les cellules sont laissées dans le dernier lavage PBS afin de prendre des photos à l'aide d'un microscope optique. Le PBS est alors décanté et les cellules perméabilisées

avec 800 µL d'éthanol 100% (Merck) durant 30 minutes. L'éthanol contenant l'Oil Red O présent dans les cellules est alors récupéré puis 250 µL est transféré dans une plaque 96 puits afin de lire la densité optique de l'éthanol à 490 nm. La valeur obtenue est alors normalisée par la quantité cellulaire grâce à un marquage de la quantité d'ADN par marquage à l'iodure de propidium. Pour cela, les cellules doivent être incubées en présence de 800 µL de solution d'iodure de propidium durant 30 minutes dans l'obscurité. La fluorescence est alors mesurée à l'aide d'un fluoroskan Ascent (Thermo scientific) à 612 nm après une excitation à 515 nm. Pour le marquage Oil Red O, le blanc correspond au puits sans cellules ayant suivi le même protocole que les puits avec cellules.

Préparation et observation des cellules SQD9 par microscopie électronique

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales (Sigma) exprimant un shARN contrôle ou un shARN ciblant TMEM45A. Après transduction, les cellules ont été amplifiées de façon à obtenir au moins 2 000 000 cellules. Après trypsinisation, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1000 rpm puis le milieu cellulaire est décanté. Le culot cellulaire est resuspendu dans 400 µL d'une solution de 2,5% en glutaraldéhyde à 70% (Agar Scientific) et 0,1 M en cacodylate pH 7,4 (Merck). La suspension cellulaire est placée dans un tube spécial (pyramidal beem capsule, #G360, Agar Scientific, Laborinpex) puis placée 2h30 à 4°C avant d'être centrifugée à 4°C pendant 5 minutes à 1000 rpm. Le culot cellulaire est ensuite rincé trois fois pendant 10 minutes avec 400 µL d'une solution de 0,2M en cacodylate pH 7,4 (Merck). Le culot est centrifugé à 4°C 2 minutes à 1000 rpm entre chaque rinçage. L'échantillon est ensuite placé à 4°C pendant 1h dans 400 µL d'une solution d'acide osmique à 1% (Merck) et de cacodylate 0,1 M à pH 7,4 (Merck) puis centrifugé à 4°C pendant 2 minutes à 1000 rpm. L'échantillon est alors placé 10 minutes dans une solution de 0,2 M en cacodylate pH 7,4 (Merck), centrifugé à 4°C pendant 2 minutes à 100 rpm avant d'être placé dans du tampon cacodylate 0,2 M à pH 7,4 (Merck) dans lequel il peut être conservé à 4°C pendant plusieurs semaines.

L'échantillon est alors déshydraté par des bains successifs d'alcool avec une centrifugation pendant 2 minutes à 2000 rpm entre chaque bain.

- Dans l'éthanol à 30%, une fois 5 minutes puis une fois 10 minutes
- Dans l'éthanol à 50%, une fois 5 minutes puis une fois 10 minutes
- Dans l'éthanol à 70%, une fois 5 minutes puis une fois 10 minutes
- Dans l'éthanol à 85%, une fois 5 minutes puis une fois 10 minutes
- Dans l'éthanol absolu trois fois 10 minutes

L'échantillon est ensuite enrobé dans de la résine (Pelco) préalablement décongelée à température ambiante durant 30 minutes. Pour cela, l'échantillon est rincé quatre fois pendant 5 minutes dans une solution d'oxyde de propylène (Aldrich) avec une centrifugation de 2 minutes à 2000 rpm entre chaque rinçage. Sous hotte, l'échantillon est laissé 15 minutes dans un mélange 75% - 25% oxyde de propylène et résine, puis 20 minutes dans un mélange 50% - 50% oxyde de propylène et résine et enfin 20 minutes dans un mélange 25% - 75% oxyde de propylène et résine. Entre chaque incubation l'échantillon est centrifugé 2 minutes à 1000 rpm. L'échantillon est ensuite laissé à 37 % toute une nuit dans de la résine pure avec le capuchon ouvert. L'échantillon est successivement passé dans une étuve à 45°C durant 1 jour puis dans une étuve à 60°C durant 3 jours. A la fin de l'expérience, l'échantillon est pris en charge par la plateforme de microscopie afin d'être coupé à l'aide d'une lame de diamant et rendu conducteur par une coloration à l'acétate uranyle et citrate de plomb avant d'être observés en microscopie électronique (Philips, Tecnai 10).

Etude de la morphologie du réseau mitochondrial par microscopie confocale

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales (Sigma) exprimant un shARN contrôle ou un shARN ciblant TMEM45A. Après transduction, les cellules ont été ensemencées dans des chambres Lab-Tek II de 2 puits de 4.2 cm^2 (Lab-Tek Brand Products, Nalge Nunc International) à raison de 60 000 cellules par chambre. Après une incubation de 24h en condition de normoxie, les cellules sont mises en contact avec 100 nM d'une sonde mitoTracker verte (Invitrogen) dans un milieu de culture sans sérum durant 30 minutes à 37°C à l'obscurité avant d'être replacées dans du milieu frais avec sérum pour une observation au microscope confocale.

Xénogreffe des cellules SQD9 dans des souris Nude

Les cellules SQD9 ont été transduites avec des particules lentivirales (Sigma) exprimant un shARN contrôle ou un shARN ciblant TMEM45A. Après transduction, les cellules ont été amplifiées en T150 puis resuspendues sur glace dans une solution à 4°C de PBS et Matrigel (Corning) avec un ratio 2 : 1 à raison de 1 000 000 de cellules dans 400 µl de solution. Ensuite, 1 000 000 de cellules ont été injectées en sous-cutané sur le flanc droit de souris Nudes femelles âgées de 8 semaines. Les tumeurs ont été mesurées tous les 2 jours à l'aide d'un pied à coulisse durant 42 jours. En considérant que les tumeurs formées sont des demi-sphères, le volume tumoral a été calculé suivant la formule : longueur x largeur x hauteur x 0,4. A la fin de l'expérience, les souris sont euthanasiées puis les tumeurs sont récupérées, photographiées et pesées. Ensuite, les masses tumorales sont sectionnées en deux, une partie plongée dans de

l'azote liquide afin de réaliser une extraction d'ARN et l'autre partie fixée dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % avant d'être montée en bloc de paraffine pour des analyses histologiques.

Extraction d'ARN à partir des tumeurs

Avant de débuter l'extraction d'ARN, il faut nettoyer l'ensemble du matériel (pinces, lames, mixeur ultra-turrax…) dans du SDS 0,5% durant 1h. Les masses tumorales sont pesées puis plongées dans du TriReagent (Invitrogen) dans un tube RNAse free à raison de 50 mg de tissus pour 1ml de TriReagent. Avant de broyer les tissus avec l'ultra-turrax, il est recommandé de réduire la tumeur en petits morceaux à l'aide d'une pince et d'une lame stérile dans une boite de Pétri stérile. L'échantillon est alors broyé avec l'ultra-turrax sur glace par séquence de 30 secondes puis incubé 5 minutes à température ambiante. L'échantillon est ensuite centrifugé à 4°C durant10 minutes à 12 000 g et le surnageant est transféré dans un nouveau tube RNAse Free. Ensuite, 200 µL de chloroforme (Merck) sont ajoutés et l'échantillon est vortexé durant 15 secondes avant d'être incubé 5 minutes à température ambiante et centrifugé à 4°C durant 15 minutes à 12 000g. La phase supérieure aqueuse contenant les ARNs est alors récupérée et les ARNs sont extraits à l'aide du kit RNeasy (Promega) en utilisant le Qiacube selon les recommandations du fournisseur.

Fixation et inclusion en paraffine des masses tumorales

Les masses tumorales sont fixées dans du paraformaldéhyde à 4% durant 24h puis les tumeurs sont sorties du fixateur avant d'être déposées dans des cassettes numérotées. La paraffine n'étant pas miscible dans l'eau, les masses sont déshydratées dans des bains d'alcool à degrés croissants puis plongées dans des bains de toluène et enfin placées dans de la paraffine chauffée à son point de fusion (Thermo Scientific Histostar). L'inclusion des tissus dans la paraffine se fait par le passage des échantillons au froid de façon à solidifier la paraffine dans des moules permettant la confection de blocs qui se montent alors sur le microtome pour la réalisation des coupes (microtome Leica RM2145).

Marquage HES des tissus

Les coupes en paraffine sont déparaffinées et réhydratées avant d'être colorées au HES (Hémalun, Erythoposine, Safran) selon le protocole du labCeti. Les étapes de déparaffinage et réhydratation sont assurées par une succession de bains de 3 minutes à base de toluol puis de

méthanol de titre décroissant (100% puis 70%) et enfin d'eau. Après la déshydratation les coupes sont colorées par différents bains. Les lames sont d'abord plongées dans trois bains de 3 minutes d'hémalun suivi d'un bain de 3 minutes dans de l'eau, d'un bain de 3 minutes dans une solution d'alcool-HCL et de trois bains de 3 minutes dans de l'eau. Les lames sont ensuite plongées dans deux bains de 3 minutes d'érythroposine, un bain de 3 minutes dans de l'eau, un bain de 3 minutes dans une solution d'alcool éthylique à 70° et enfin deux bains de 3 minutes dans une solution d'alcool isopropyl à 100%. Pour finir, les lames sont plongées dans deux bains de 3 minutes de safran, deux bains de 3 minutes d'alcool isopropyl à 100% et deux bains de 3 minutes de Toluol. Les lames sont ensuite montées à l'aide d'un milieu de montage neutre (DPX, Merck) puis observées en microscopie optique (Leica ICC50HD).

Immunomarquage des protéines CD31 et F4/80

Les coupes en paraffine sont déparaffinées par deux bains de 3 minutes dans du toluol puis deux bains de 3 minutes dans du méthanol 100% et enfin un bain de 3 minutes dans du méthanol 70% avant d'être déposées 10 minutes dans de l'eau. Les lames sont rincées dans du PBS avant d'être déposées deux fois 3 minutes dans un bain de glycine 0,1M (Fisher) puis rincées à nouveau dans du PBS. Les lames sont ensuite placées 10 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% (Merck) et rincées au PBS. Les lames sont incubées 1h en présence de PBS-BSA 0,2% (VWR) avant d'être mis en contact avec 50 µL d'anticorps primaire (tableau R1) à 4°C durant une nuit dans une chambre humide. Les lames sont ensuite rincées trois fois 5 minutes avec une solution de PBS-BSA 0,2% (VWR) avant d'être incubées 1h à l'obscurité en présence de 50 µL d'anticorps secondaire couplé à la péroxydase (tableau R1). Puis les lames sont rincées trois fois 5 minutes dans une solution de PBS-BSA 0,2% (VWR). Le signal est ensuite révélé au DAB (Dako) selon les instructions du fournisseur puis la réaction est stoppée en plongeant les lames dans de l'eau distillée. Suite au marquage, les lames sont plongées quelques secondes dans une solution d'hémalun puis rincées à l'eau avant d'être déshydratées à l'isopropanol (deux bains de 3 minutes) et au toluol (deux bains de 3 minutes). Les lames sont montées à l'aide d'un milieu de montage neutre (DPX, Merck) puis observées en microscopie optique (Leica ICC50HD).

Discussion et perspectives

A l'heure actuelle, le cancer reste un problème majeur de santé publique. Le cancer est une maladie causée par une succession d'altérations génétiques et épigénétiques entrainant l'acquisition de propriétés telles qu'une prolifération incontrôlée, une résistance à la mort cellulaire par apoptose et l'acquisition d'un pouvoir invasif. Ces propriétés décrites par Hanahan et Weinberg sont nécessaires au développement de tumeurs agressives. De nombreux traitements ont été mis en place pour lutter contre le cancer : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie en sont les plus courants. Cependant des mécanismes de résistance aux traitements et notamment à la chimiothérapie rendent les traitements inopérants. Dès lors, il est essentiel d'identifier ces mécanismes de résistance, mais également les acteurs impliqués, afin d'améliorer l'efficacité des traitements contre le cancer.

Des études ont mis en évidence que l'apparition de ces résistances ne provenait pas uniquement d'une adaptation des cellules cancéreuses elles-mêmes, mais également du microenvironnement. Lors de la progression tumorale, les cellules cancéreuses sont exposées à divers stress. Un des stress les plus importants est l'hypoxie. En effet, la croissance de la masse tumorale induit une angiogenèse importante qui assure la distribution en oxygène et nutriments. Cette formation accrue de néovaisseaux entraine le développement d'un réseau vasculaire tumoral anarchique. Ainsi certaines zones de la tumeur, notamment celles au centre de la masse tumorale, présentent des zones d'hypoxie dont la pression partielle en oxygène est trop faible par rapport aux besoins des cellules cancéreuses. L'hypoxie peut entrainer une résistance aux agents chimiothérapeutiques soit en limitant la diffusion des agents anti-cancéreux au centre de la tumeur, soit par l'induction de l'expression de gènes cibles en réponse au stress que représente l'hypoxie. En effet, en condition d'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 est activé et induit l'expression de divers gènes cibles dont *TMEM45A*, impliqué dans la chimiorésistance.

Lors de cette thèse, nous avons étudié le rôle de la protéine TMEM45A dans la chimiorésistance, mais également tenté d'identifier par quel mécanisme cette protéine peut moduler la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques.

1. *Expression de l'ARNm de TMEM45A dans divers types de cancer*

Le niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A a été analysé dans des biopsies de patients atteints de différents types de cancer. TMEM45A est surexprimé dans le tissu tumoral en comparaison au tissu sain adjacent dans le cancer du sein, le cancer du rein et le cancer ORL. Ces résultats suggèrent que TMEM45A aurait un rôle dans le développement tumoral et/ou la réponse aux traitements dans le cas de ces cancers. Nous pouvons alors nous demander si cette

augmentation d'expression dans ces cancers est liée à une stabilisation du facteur de transcription HIF-1. Dans le cas du cancer du rein et du cancer ORL, le niveau d'expression d'une autre cible de HIF-1, CAIX, a été analysé et pour une majorité de patients, une surexpression du gène *TMEM45A* est associée à une surexpression du gène *CAIX*. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre le niveau d'expression des deux gènes étudiés. Ainsi il serait intéressant d'évaluer l'expression d'autres gènes cibles de HIF-1 mais également d'analyser la stabilisation de la protéine HIF-1α par western blot.

2. *TMEM45A apporte-t-il un avantage aux cellules cancéreuses ?*

Afin de répondre à cette question nous avons étudié l'impact de l'invalidation de TMEM45A dans trois lignées cellulaires : les cellules CAL27 (oropharynx) et les cellules SQD9 (larynx) dans le cas du cancer ORL et les cellules RCC4 plus pVHL dans le cas du cancer du rein. Dans un premier temps, nous avons analysé le niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A dans ces trois lignées en normoxie et en hypoxie. TMEM45A est surexprimé en hypoxie dans les cellules CAL27, SQD9 et RCC4 plus pVHL. De plus, le niveau d'expression de ce gène diffère entre les modèles étudiés avec un niveau d'expression de TMEM45A croissant dans les cellules CAL27, SQD9 et RCC4 plus pVHL. De façon intéressante, la sensibilité des cellules au cisplatine est plus importante dans les cellules CAL27 dont le niveau d'expression et l'induction de TMEM45A en hypoxie est la plus faible. Sachant que dans la littérature, TMEM45A a été impliqué dans la résistance conférée par l'hypoxie face à la mort des cellules d'hépatocarcinome induite par l'étoposide et des cellules de cancer mammaire exposées au taxol et que ces trois lignées cellulaires sont protégées en condition d'hypoxie face à la mort cellulaire induite par le cisplatine, nous avons émis l'hypothèse que la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine pouvait être modulée par la protéine TMEM45A.

Une invalidation de l'expression de TMEM45A a alors été réalisée par siARN et shARN. Cette invalidation entraine bien une diminution du niveau d'expression de l'ARNm de TMEM45A dans les trois lignées cellulaires. L'invalidation du niveau d'expression de TMEM45A a également été validée au niveau protéique par immunomarquage. Ces expériences ont permis de confirmer la localisation de TMEM45A au réseau trans-Golgien dans les cellules de cancer du rein et du cancer ORL. Cependant, lorsque TMEM45A est invalidé par shARN dans les cellules RCC4 plus pVHL, l'invalidation n'est pas totale en condition d'hypoxie et une perte d'invalidation a été observée. Dans ce modèle cellulaire, l'induction de l'expression du gène *TMEM45A* en condition d'hypoxie est importante. Cependant, l'expression du shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A n'est pas induite par l'hypoxie. Ainsi dans ces conditions, le pool d'ARNm de TMEM45A pourrait être plus important que le pool de shARN 22 disponible au sein des cellules, entrainant une saturation des shARN par rapport à l'ARNm de TMEM45A. Cependant, cette hypothèse n'explique pas l'observation d'une augmentation du nombre de

cellules exprimant TMEM45A en condition d'hypoxie au fil des passages post transduction. Plusieurs possibilités peuvent expliquer cette observation. La première serait une mauvaise intégration du plasmide au sein du génome des cellules cancéreuses et ainsi la perte de la transmission de la séquence codante du shARN au fil des générations. Cette possibilité a été écartée par une sélection régulière à la puromycine. La deuxième possibilité serait un nombre insuffisant de particules virales par cellule lors de l'infection. Ainsi des cellules ayant reçu 10 particules virales expriment suffisamment le shARN 22 pour observer une diminution d'expression de TMEM45A quasi totale alors qu'une cellule ayant reçu uniquement 5 des 10 particules virales prévues n'exprime pas suffisamment de shARN 22 pour invalider TMEM45A. Pour tester cette hypothèse nous pourrions augmenter la MOI utilisée en vérifiant préalablement qu'une telle concentration en particules virales n'est pas délétère pour les cellules. En effet, en augmentant le nombre de séquences insérées, nous augmentons également le risque que l'insertion se fasse dans une région importante du génome. La dernière possibilité serait un phénomène épigénétique. En effet, le vecteur inséré au sein des cellules cancéreuses comprend différents promoteurs. Alors que l'expression du shARN 22 est sous le contrôle du promoteur U6, le gène de résistance à la puromycine est quant à lui sous le contrôle du promoteur hPGK (phosphoglycérate kinase humaine). Ces deux promoteurs ne font pas intervenir la même ARN polymérase. L'ARN polymérase II se lie au promoteur hPGK alors que le promoteur U6 est reconnu par l'ARN polymérase III, excluant une compétition entre ces deux promoteurs. Cependant, une étude a montré que le promoteur U6, promoteur riche en ilots CpG, serait plus fortement méthylé par des méthyltransférases empêchant ainsi le recrutement de l'ARN polymérase (Selvakumar, Gjidoda et al. 2012). Il est alors possible que dans la lignée RCC4 plus pVHL, l'expression du shARN 22 soit diminuée par une méthylation du promoteur U6. Il serait alors intéressant de réaliser l'invalidation de TMEM45A à l'aide d'un autre vecteur ne subissant pas de méthylation.

2.1 Rôle de TMEM45A dans les cellules CAL27

L'invalidation de l'expression de TMEM45A n'a aucun impact sur les cellules CAL27. En effet, aucune modification au niveau de la morphologie et de la prolifération des cellules cancéreuses n'a été observée. De plus, l'absence de TMEM45A ne semble pas moduler la sensibilité des cellules CAL27 au cisplatine, que ce soit en normoxie ou en hypoxie. Cependant, la sensibilité à l'agent anti-cancéreux semble être impactée par la transfection ou la transduction par elle-même. Ainsi pour étudier l'impact de l'invalidation de TMEM45A, il faudrait réaliser de nouvelles invalidations soit avec un autre contrôle qui n'interfère pas avec la chimiosensibilité des cellules, soit suivant un autre protocole. Les premières observations suggèrent que l'absence de TMEM45A n'altère pas les cellules CAL27. Si ce gène est faiblement exprimé dans ces cellules, il est possible que son invalidation ne soit pas délétère

pour la cellule. La résistance en hypoxie fait alors intervenir d'autres mécanismes de chimiorésistance. En effet, la protection face aux agents anti-cancéreux conférée par l'hypoxie ne semble pas être modulée par TMEM45A dans cette lignée. Ces résultats mettent en avant que la protéine TMEM45A n'intervient pas dans la chimiosensibilité de toutes les lignées cellulaires.

2.2 Rôle de TMEM45A dans les cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL

Contrairement aux cellules CAL27, l'invalidation de TMEM45A a différents impacts sur les lignées cellulaires SQD9 et RCC4 plus pVHL. L'absence de la protéine TMEM45A entraine une diminution de la prolifération des cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL. En effet, un retard de prolifération a été observé entre les cellules contrôles et les cellules invalidées pour TMEM45A. Cependant, des observations préliminaires montrent une accumulation des cellules en phase S et non un arrêt du cycle cellulaire. Il est alors possible que l'absence de TMEM45A induise un ralentissement du cycle cellulaire. La progression des cellules dans le cycle cellulaire est régulée par de nombreux points de contrôle. Cette régulation passe par une variation cyclique de l'activité des différents complexes cyclines/Cdk via leur phosphorylation ou leur distribution au sein de la cellule. Ces points de contrôle assurent notamment la qualité du cycle cellulaire et en particulier la fidélité de la duplication de l'ADN. En cas de problèmes, ces mécanismes de surveillance stoppent la progression du cycle et activent les voies de réparation ou de mort cellulaire par apoptose. Ainsi dans le cas des cellules invalidées, il est possible que les cellules restent coincées en phase S plus longtemps soit par un ralentissement de la formation de la fourche de réplication et/ou de la progression de l'ADN polymérase, soit par une diminution de la fidélité de la réplication nécessitant une réparation des dommages induits. Ces résultats pourraient être validés par une étude de la progression des cellules dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux après synchronisation des cellules et/ou par une étude des complexes cycline/Cdk.

De plus, la présence de larges vésicules a été observée dans les cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A. Ces observations apportent deux informations. La première est que les cellules SQD9 semblent être stressées par l'absence de TMEM45A. La seconde est que l'invalidation de TMEM45A n'a pas le même type d'impact suivant le modèle cellulaire puisque les cellules RCC4 plus pVHL ne montrent aucun changement de morphologie lorsque TMEM45A est invalidé. Nous avons essayé d'identifier la nature de ces vésicules, qui ne sont ni des gouttelettes lipidiques ni des vésicules autophagiques. Le rôle physiologique de TMEM45A est encore inconnu. Cependant au vu de sa localisation subcellulaire, nous pouvons émettre l'hypothèse que TMEM45A serait impliqué dans le trafic vésiculaire et/ou la maturation des protéines entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, soit par un rôle direct, soit par la régulation d'une cible impliquée dans le transport et la maturation des protéines au sein

de la cellule. Ainsi l'absence de cette protéine pourrait avoir un impact sur la formation des vésicules et l'accumulation de protéines mal conformées. Dans les cellules invalidées, une surexpression du gène SEPT11 a été observée. Ce gène code pour une protéine de la famille des septines impliquées dans le trafic vésiculaire et dans la formation de vésicules lors de la phagocytose. Cette dérégulation, à confirmer au niveau protéique, pourrait être responsable de la formation aberrante de vésicules dans les cellules invalidées pour TMEM45A. Un immunomarquage de protéines impliquées dans le trafic vésiculaire pourrait apporter des informations supplémentaires. Il existe trois catégories principales de vésicules dont les protéines de surface sont différentes, la clathrine formant les vésicules impliquées dans le transport entre le Golgi et la membrane plasmique et COPI et COPII formant les vésicules responsables du transport des protéines entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Alberts B 2002).

Dans le cas des cellules SQD9, une analyse transcriptomique par RNA sequencing a été réalisée dans les cellules contrôles et invalidées pour TMEM45A en absence et en présence de cisplatine. Les résultats ont montré une dérégulation de nombreux gènes et possiblement de diverses voies de signalisation comme présenté dans l'article soumis dans JBC. Ces analyses montrent qu'une exposition au cisplatine entraine la dérégulation de plus de 10 000 gènes. Ainsi nous avons comparé les gènes dérégulés par le cisplatine dans les cellules contrôles à ceux dérégulés dans les cellules invalidées permettant d'identifier des gènes dont l'expression est modulée différemment en présence de cisplatine dans les cellules invalidées en comparaison aux cellules contrôles. L'étude des principaux gènes dérégulés en absence et en présence de cisplatine a permis d'identifier des dérégulations de voies de signalisation pouvant expliquer l'implication de TMEM45A dans les phénotypes observés. Néanmoins, cette analyse est une étude transcriptomique, ainsi elle ne permet pas d'identifier les impacts de l'absence de TMEM45A sur la production, la dégradation ou la localisation d'autres protéines. De plus, certains gènes peu étudiés n'ont pas été associés à des voies de signalisation. Ainsi il est important d'analyser l'ensemble des gènes et pas seulement ceux dont l'implication dans des voies de signalisation est déjà connue. Il est évidemment également nécessaire de confimer les changements d'expresssion en ARNm au niveau protéique.

L'invalidation de TMEM45A dans les cellules SQD9 entraine également une modification du métabolisme des mitochondries. Outre la désorganisation du réseau mitochondrial visible en microscopie confocale, une augmentation de la réduction du sel de tétrazolium en dérivé formazan a été observée dans les cellules invalidées pour TMEM45A durant les tests de viabilité. Cette réduction fait intervenir la succinate déshydrogénase, réductase présente au sein des mitochondries. Les résultats de RNA sequencing ont révélé une surexpression de l'ARNm du gène *UQCR10* (Ubiquinol-Cytochrome C Reductase, Complex III Subunit X) dans les cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A. Ce gène code pour une réductase présente comme la succinate déshydrogénase au sein de la chaine respiratoire des mitochondries. Cette augmentation d'expression en absence de TMEM45A pourrait expliquer l'augmentation de la

réduction du sel de tétrazolium en dérivé formazan. Ce résultat reste à valider au niveau protéique. Il serait également intéressant d'observer le niveau d'expression de ce gène dans les cellules RCC4 plus pVHL pour lesquelles aucune modification du métabolisme des mitochondries n'a été observée.

L'invalidation de TMEM45A dans les cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL entraine un ralentissement du cycle cellulaire, mais également la présence de vésicules et une dérégulation de l'activité mitochondriale des cellules SQD9, cellules qui semblent plus sensibles à l'absence de TMEM45A que les cellules RCC4 plus pVHL. Cependant, l'absence d'expression de cette protéine n'induit pas de stress létal pour les cellules. Ces observations indiquent que la protéine TMEM45A apporte un avantage aux cellules cancéreuses sans être néanmoins indispensable à leur survie. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par E. Roegiers et A. Hayez concernant l'absence d'effet du knock out de TMEM45A dans les souris au niveau de leur viabilité (Hayez, Roegiers et al. 2016).

3. Double rôle de la protéine TMEM45A dans la chimiosensibilité au cisplatine

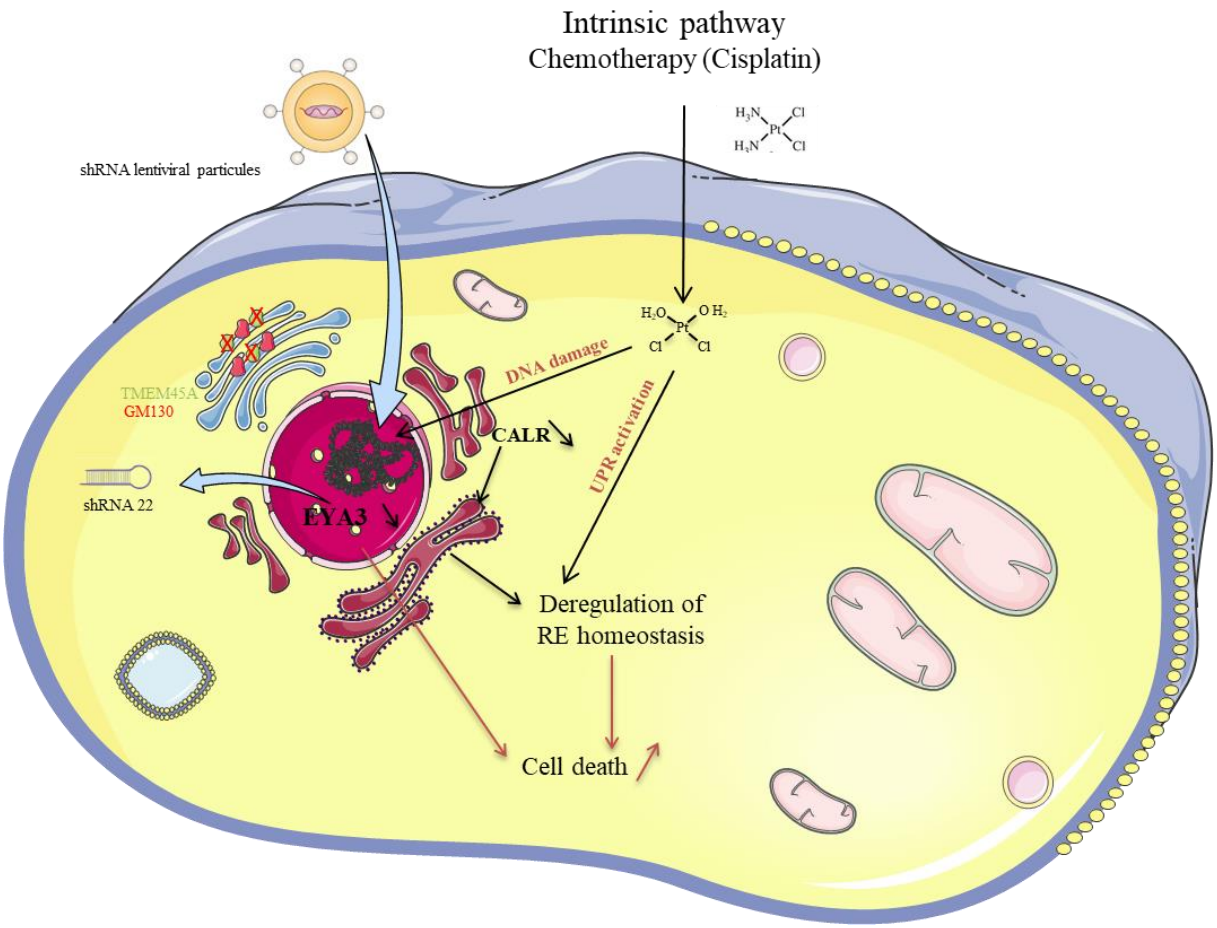
Le rôle de TMEM45A dans la sensibilité au cisplatine a été étudié dans les cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL. L'absence de TMEM45A induit une augmentation de la sensibilité au cisplatine des cellules SQD9 suggérant un rôle anti-apoptotique dans cette lignée cellulaire au même titre que dans les cellules d'hépatocarcinome et les cellules de carcinome mammaire étudiées par Flamant et al (Flamant, Roegiers et al. 2012). L'augmentation de la chimiosensibilité des cellules SQD9 au cisplatine a été observée à la fois en conditions de normoxie et d'hypoxie. C'est la première fois que TMEM45A est impliqué dans la chimiosensibilité en condition de normoxie. Ces résultats suggèrent que la présence de cette protéine, même en faible quantité lorsque les cellules sont incubées en condition de normoxie, influence la sensibilité au cisplatine.

De façon surprenante, l'absence de TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL entraine une résistance des cellules cancéreuses au cisplatine en normoxie et en hypoxie. C'est la première fois également que la protéine TMEM45A est décrite comme étant pro-apoptotique dans des cellules cancéreuses. Ces informations indiquent que TMEM45A joue un rôle complexe dans la modulation de la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques. En effet, la protéine n'a aucun impact sur la chimiosensibilité au cisplatine dans les cellules CAL27 alors qu'elle semble être anti-apoptotique dans les cellules SQD9 et pro-apoptotique dans les cellules RCC4 plus pVHL.

3.1 TMEM45A et les dommages à l'ADN

Afin d'identifier par quel mécanisme TMEM45A influence la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine, l'induction et la réparation des dommages à l'ADN induits par le cisplatine ont été étudiés. Pour cela, l'abondance de la protéine γH2AX, marqueur des dommages à l'ADN, a été analysée par western blot et immunomarquage. Après une exposition au cisplatine, une augmentation de l'abondance de γH2AX est observée dans les cellules contrôles des lignées SQD9 et RCC4 plus pVHL. Ces résultats signifient que le cisplatine induit des dommages à l'ADN dans les cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL. En présence de cisplatine, alors que la quantité de ces dommages augmente dans les cellules SQD9 lorsque TMEM45A est invalidée, la quantité de dommages détectés dans les cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A diminue. Plusieurs hypothèses sont possibles, l'absence de TMEM45A peut moduler l'induction des dommages à l'ADN, la réparation des dommages à l'ADN et/ou l'induction de la mort cellulaire par apoptose. Afin d'analyser l'induction des dommages à l'ADN et la capacité des cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL à détecter les dommages, nous avons étudié le profil de phosphorylation des protéines cibles de ATM et ATR par western blot, l'abondance de γH2AX et le clivage de PARP en présence de cisplatine. Dans le cas des cellules SQD9, l'induction et la détection des dommages à l'ADN induits par le cisplatine ne semblent pas être impactées par l'absence de TMEM45A. Même si des résultats similaires ont été obtenus pour la lignée RCC4 plus pVHL, une légère diminution de la phosphorylation des cibles de ATM et ATR a pu être observée dans les cellules invalidées exposées au cisplatine en comparaison aux cellules contrôles. Ces observations peuvent être le signe soit d'une diminution de l'induction des dommages à l'ADN, soit d'une diminution de la reconnaissance des dommages induits par le cisplatine. Dès lors, il serait intéressant d'étudier l'import et l'export du cisplatine au sein des cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A. En effet, une autre protéine de la famille TMEM, TMEM205 a été impliquée dans le transport du cisplatine via sa séquestration dans des vésicules, induisant alors une résistance des cellules cancéreuses au cisplatine (Shen, Ma et al. 2010, Shen and Gottesman 2012). Il est donc possible que l'absence de TMEM45A module la prise en charge du cisplatine et son transport au sein des cellules. Pour cela, il est possible de marquer la molécule de cisplatine avec une sonde fluorescente et de suivre son transport au sein des cellules par microscopie confocale (Shen, Ma et al. 2010).

La capacité des cellules cancéreuses à réparer les dommages à l'ADN présents après une exposition au cisplatine a également été investiguée. Pour cela, les deux lignées cellulaires ont été exposées au cisplatine durant 4h, temps d'incubation permettant d'observer des dommages à l'ADN avant induction de la mort cellulaire par apoptose. Les données obtenues lors du séquençage des ARN des cellules SQD9 ont montré une diminution du niveau d'expression de EYA3, diminution validée au niveau protéique. Ce gène code pour une protéine impliquée dans la déphosphorylation de γH2AX et donc dans la balance mort/survie des cellules cancéreuses



<u>Figure D1</u> : Caractérisation de la sensibilité au cisplatine des cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A

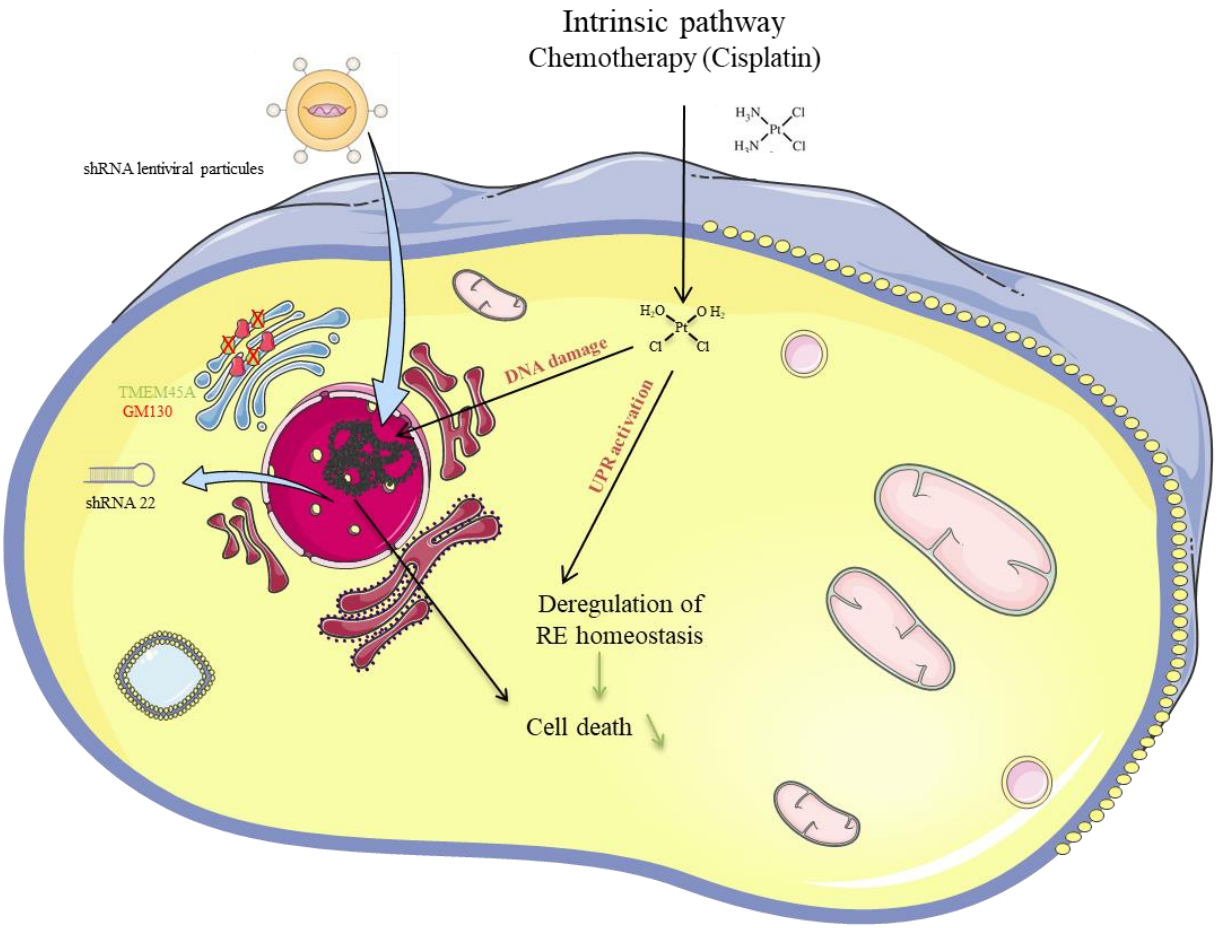
L'invalidation de TMEM45A entraine une dérégulation de l'expression du gène *EYA3* diminuant l'efficacité de la réparation des dommages à l'ADN induit par le cisplatine via la voie de recombinaison homologue. L'absence d'expression de TMEM45A induit également un stress basal du réticulum endoplasmique et ainsi une activation de la voie de signalisation UPR également activée par une incubation en présence de cisplatine, entrainant une activation sévère de cette voie de signalisation. L'ensemble de ces dérégulations augmente la sensibilité des cellules SQD9 au cisplatine.

après induction des dommages à l'ADN. Nous avons alors étudié le recrutement d'une protéine importante dans la recombinaison homologue, RAD51. Dans le cas des cellules SQD9, l'absence de TMEM45A entraine une diminution du recrutement de la protéine RAD51 aux points de cassure, ce qui diminue l'efficacité de la réparation des dommages à l'ADN par la voie de recombinaison homologue (figure D1). Dans le cas des cellules RCC4 plus pVHL, le recrutement de RAD51 aux points de cassure ne semble pas être altéré. Cependant l'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois et doit donc être répétée. De plus, les résultats montrent une détection des dommages à l'ADN et un niveau d'abondance de RAD51 plus importants dans les cellules invalidées pour TMEM45A. Au vu de la localisation cytoplasmique de RAD51 qui devrait être nucléaire, les résultats obtenus ne sont pas interprétables. Il faut donc, pour conclure, répéter l'expérience.

La voie de réparation des dommages à l'ADN étudiée ici est la voie de recombinaison homologue. L'étude des autres voies de réparation des dommages à l'ADN, notamment la voie NHEJ ou la voie NER, doit être envisagée. En effet, la voie de réparation par excision de base (NER) fait intervenir les protéines de la famille ERCC et en particulier ERCC1. Les résultats de RNA sequencing ont révélé une diminution d'expression du gène *ERCC8* dans les cellules invalidées pour TMEM45A en présence de cisplatine. ERCC8 code pour une protéine du complexe CSA impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN via la voie TCR (transcription-coupled repair). De plus, les voies de réparation des dommages à l'ADN suite à une exposition au cisplatine peuvent être différentes suivant le type cellulaire. Ainsi dans la lignée RCC4 plus pVHL, une autre voie de réparation des dommages à l'ADN pourrait être induite. Cette hypothèse mérite d'être investiguée.

3.2 TMEM45A et l'activation de la voie UPR

Sachant que le cisplatine peut également induire la mort cellulaire par apoptose via un stress du réticulum endoplasmique, l'activation de la voie UPR a été étudiée en réponse au cisplatine dans les deux modèles. Lorsqu'une cellule est soumise à un stress, ici une exposition au cisplatine, elle induit des voies de signalisation en réponse à ce stress. La présence de cisplatine peut induire un stress du réticulum endoplasmique auquel la cellule répond en induisant la voie UPR. L'induction de cette voie entraine l'activation des acteurs PERK, ATF6 et IRE1. L'activation de ces acteurs se fait séquentiellement avec en premier lieu une activation de PERK, puis d'ATF6 et enfin d'IRE1. Les cellules RCC4 plus pVHL étant incubées en présence de cisplatine durant 48h, nous avons étudié principalement l'activation de IRE1. Cependant comme son activation est tardive, les cellules SQD9 ont été exposées également au cisplatine durant 48h. Une telle exposition des cellules SQD9 au cisplatine entraine une augmentation de la sensibilité des cellules invalidées pour TMEM45A en comparaison aux cellules contrôles. Le niveau de phosphorylation de IRE1 n'étant pas toujours observable par western blot, son



<u>Figure D2</u> : Caractérisation de la sensibilité au cisplatine des cellules RCC4 invalidées pour TMEM45A

L'invalidation de TMEM45A entraine une diminution de l'activation de la voie de sgnalisation UPR suite à une incubation en présence de cisplatine. Cette activation modérée en absence de TMEM45A favorise la survie des cellules cancéreuses, menant à une résistance à la mort cellulaire induite par le cisplatine.

activation a été mesurée par l'étude de l'épissage alternatif de XBP1. Suite à une exposition au cisplatine, la voie UPR semble être induite. En comparaison aux cellules contrôles, en présence de cisplatine, cette induction est plus forte dans les cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A alors qu'elle est moindre dans les cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A. Il a déjà été publié qu'une activation de l'UPR pouvait moduler la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques (Xu, Wang et al. 2014, Notte, Rebucci et al. 2015). Les résultats du RNA sequencing ont montré une dérégulation du niveau d'expression de plusieurs gènes exprimés en condition de stress du réticulum endoplasmique, suggérant une dérégulation de la voie UPR dans les cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A. En effet, en condition de normoxie et en absence d'agents anti-cancéreux, l'invalidation de TMEM45A induit une diminution de l'expression de la calréticuline entrainant probablement une accumulation de protéines mal repliées qui pourrait provoquer alors un stress du réticulum endoplasmique et donc une activation de la voie UPR. Cette activation se traduit notamment par une augmentation de l'expression, visible dans l'analyse transcriptomique, des gènes *PDIA6, MANF, ATF6B* et *HSP90B1,* signe d'un stress du réticulum endoplasmique. En effet, PDIA6 et HSP90B1 sont impliqués dans la prise en charge des protéines mal conformées permettant de diminuer l'accumulation de protéines mal repliées. La protéine MANF, quant à elle, inhibe l'induction de l'apoptose afin de laisser du temps à la cellule pour rétablir l'homéostasie du réticulum endoplasmique. Enfin, ATF6B qui forme un homodimère ou un hétérodimère avec ATF6A, est un des acteurs de la voie UPR. De plus, lorsque les cellules sont incubées 24h en présence de cisplatine, une dérégulation du niveau d'expression de l'ARNm de XBP1 est également observée dans les cellules invalidées pour TMEM45A en comparaison aux cellules contrôles. Ces observations suggèrent que l'absence de TMEM45A dans les cellules SQD9 induirait un stress basal du réticulum endoplasmique auquel s'ajouterait le stress induit lorsque les cellules sont exposées au cisplatine (figure D1). Dans le cas des cellules RCC4 plus pVHL, l'absence de TMEM45A ne semble pas induire de stress basal du réticulum endoplasmique (figure D2).

Il a déjà été décrit dans la littérature qu'un stress modéré du réticulum endoplasmique pouvait mener à une résistance aux agents chimiothérapeutiques alors qu'un stress sévère conduirait à la mort cellulaire par apoptose (Bravo, Parra et al. 2013). Ainsi, une exposition au cisplatine dans les cellules SQD9 entrainerait un stress plus important du réticulum endoplasmique et ainsi l'activation de la mort cellulaire par apoptose alors que dans les cellules RCC4 plus pVHL la présence de cisplatine entrainerait un stress modéré du réticulum endoplasmique se traduisant par une résistance des cellules cancéreuses à l'agent chimiothérapeutique.

Afin de valider ces résultats, les modulations d'expression des gènes *PDIA6, MANF, ATF6B* et *HSP90B1* doivent être vérifiées au niveau protéique, et il serait intéressant d'investiguer les autres acteurs de la réponse UPR. De plus, dans la littérature, il est décrit que la principale caspase activée lors de la mort cellulaire par apoptose suite à un stress du réticulum

endoplasmique serait la caspase 12. Ainsi il serait intéressant d'étudier l'activation de cette caspase dans les modèles étudiés.

3.3 TMEM45A et l'apoptose

La mort cellulaire par apoptose fait intervenir des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. De plus, dans le cas du cisplatine, la mort cellulaire peut être induite par l'activation de récepteur de mort tels que TNFR et Fas. Le niveau d'expression de gènes anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et p21, de gènes pro-apoptotiques tels que Bax, Bad et Bak mais également du gène TNFR a été étudié par RT-qPCR. L'absence de TMEM45A n'a pas d'impact sur le niveau d'expression de ces différents gènes en absence ou en présence de cisplatine dans les deux modèles. Ces résultats suggèrent que la protéine TMEM45A module la sensibilité au cisplatine en amont de l'induction de la voie de mort par apoptose via un défaut de réparation des dommages à l'ADN ou via une activation différentielle de l'UPR. Mais cette protéine n'a aucun impact sur le niveau d'expression des gènes impliqués dans l'activation ou la répression de l'apoptose. Cependant, le niveau d'expression d'autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, telles que Bcl-Xl devrait être étudié. De plus, il est nécessaire de valider ces résultats par le niveau d'expression protéique de ces différentes cibles, mais également d'étudier leur activation.

D'autres mécanismes de résistance existent et non pas encore été investigués. Outre la prise en charge et le transport du cisplatine au sein de la cellule, l'activation de la molécule du cisplatine dans le cytoplasme devrait être étudiée. En effet, les analyses transcriptomiques réalisées dans les cellules SQD9 ont mis en avant une dérégulation de la voie de détoxification par le glutathion, voie impliquée dans la résistance au cisplatine. Il serait alors très intéressant d'étudier si cette voie est réellement dérégulée dans les deux lignées cellulaires et si elle pourrait expliquer les modulations de chimiosensibilité observées.

L'ensemble des résultats *in vitro* obtenus durant cette thèse devront être validés dans d'autres lignées cellules de cancer ORL et de cancer rénal mais également avec un autre shARN permettant d'invalider le niveau d'expression de TMEM45A. De plus, afin de confirmer l'implication de TMEM45A dans la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine, il est primordial d'étudier la sensibilité des cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL soit après une surexpression de la protéine TMEM45A, soit après la restauration du niveau d'expression de TMEM45A grâce à une transfection de l'ADNc du gène d'intérêt. Pour cela, il est essentiel que les shARN utilisés pour l'invalidation ciblent une région non codante de l'ARNm cible telle que la région 3'UTR, région absente dans l'ADNc transfecté permettant à l'ARNm transcrit de ne pas être ciblé par le shARN.

4. *TMEM45A a-t-il un rôle dans la croissance tumorale* in vivo *?*

L'implication de la protéine TMEM45A dans la croissance tumorale a été étudiée *in vivo* par l'implantation de cellules SQD9 contrôles ou invalidées pour TMEM45A dans des souris Nude. En absence de la protéine TMEM45A, la croissance tumorale est plus grande par rapport aux tumeurs issues des cellules contrôles. En effet, les tumeurs dont les cellules cancéreuses sont invalidées pour TMEM45A ont une croissance tumorale plus rapide et plus importante avec une taille des tumeurs augmentée en comparaison aux tumeurs contrôles. De plus, les tumeurs issues des cellules SQD9 contrôles ont montré une diminution de la prise tumorale. Ces observations, opposées à celle des expériences *in vitro,* suggèrent que TMEM45A inhiberait la croissance des tumeurs *in vivo*.

Le profil histologique des tumeurs est modifié par l'invalidation de TMEM45A. En effet, en absence de cette protéine, le ratio entre les cellules cancéreuses et les cellules du stroma composant la tumeur est modifié. Dans le cas des tumeurs dont les cellules cancéreuses sont invalidées pour TMEM45A, la masse tumorale est plus dense en cellules cancéreuses que les tumeurs issues des cellules contrôles. De plus, le stroma (notamment les fibres de collagène) est moins important dans les tumeurs invalidées pour TMEM45A en comparaison aux tumeurs contrôles. Plusieurs possibilités peuvent être envisagées pour expliquer ces observations. L'absence de TMEM45A peut influencer la croissance tumorale soit au niveau de la prise de la tumeur notamment via la dégradation du matrigel qui comprend du collagène, soit au niveau de la prolifération des cellules cancéreuses elles-mêmes qui vont alors stimuler fortement l'angiogenèse soit en favorisant l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire.

Un immunomarquage des cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins et des macrophages, cellules du système immunitaire, a été réalisé afin d'évaluer leur répartition dans les tumeurs. L'invalidation de TMEM45A ne semble pas impacter la formation de néovaisseaux au sein des tumeurs. La composition du microenvironnement en périphérie des tumeurs est quant à elle modulée par l'absence de TMEM45A au sein des cellules cancéreuses. En effet, une diminution de l'infiltrat lymphocytaire a été observée dans les tumeurs dont les cellules cancéreuses n'expriment pas TMEM45A. La présence de macrophages a été observée à la périphérie des tumeurs contrôles et invalidées pour TMEM45A. Le recrutement de ces cellules du système immunitaire au près des tumeurs ne semble pas être affecté par l'invalidation de TMEM45A avec une abondance de ces cellules similaire entre les deux conditions. Cependant, il serait intéressant d'analyser leur polarisation en macrophages M1 anti-tumoraux ou macrophages M2 pro-tumoraux. En effet, une modulation de la polarisation des macrophages pourrait aussi être impliquée. Cette analyse est réalisable par un immunomarquage du marqueur iNOS spécifique des macrophages M1 et du marqueur ARG1 spécifique des macrophages M2 sur les coupes histologiques des tumeurs.

Ces dernières années, de nombreux gènes ont été impliqués dans la régulation de la croissance tumorale via une régulation de la réponse immunitaire. C'est le cas du gène GMFB, codant pour une protéine impliquée dans l'inhibition de la prolifération tumorale. Cette protéine a été impliquée dans la différenciation des cellules T en cellules T « killers » $CD4^-/CD8^+$. Ce sont ces lymphocytes, représentant 75% de l'infiltrat lymphocytaire, qui une fois activés éliminent les cellules cancéreuses (Yamazaki, Tateyama et al. 2005). Ainsi une diminution d'expression de ce gène peut induire un échappement au système immunitaire des cellules cancéreuses. Une telle diminution d'expression est observée dans les cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A.

Ainsi l'invalidation de TMEM45A pourrait entrainer une diminution d'expression du gène GMFB dans les cellules cancéreuses, inhibant alors l'activation des lymphocytes T $CD8^+$. Cette activation engendrait par les cellules contrôles pourrait expliquer la diminution du nombre de tumeurs développées au sein de ce groupe. Cependant, le modèle de souris Nude choisi pour notre étude est déplété pour le gène codant pour les lymphocytes T. Elles ne sont donc pas censées produire de lymphocytes T. Il est alors important d'analyser si les lymphocytes recrutés à la périphérie des tumeurs sont des lymphocytes T ou bien des lymphocytes B. Cette identification peut se faire par un marquage histologique du marqueur CD8. Les lymphocytes B représentent 20 % des lymphocytes infiltrant et leur rôle au sein du microenvironnement est encore mal connu. Cependant ces derniers sont décrits comme pro-tumoraux (Yuen, Demissie et al. 2016). L'infiltrat lymphocytaire est également composé à 5% de cellules NK. Ces cellules présentent dans les souris Nude pourraient également être investiguées.

Un autre gène intéressant dérégulé dans les cellules SQD9 invalidées pour TMEM45A est le gène *TLR7*. Ce gène code pour une protéine qui fait partie de la famille des récepteurs Toll-like impliqués dans la reconnaissance des ligands provenant soit des pathogènes (PAMPs pour Pathogen-Associated Molecular Patterns), soit des cellules en mort cellulaire (DAMPs pour Damage-Associated Molecular Patterns) (Newton and Dixit 2012). Ces récepteurs jouent un rôle dans la réponse immunitaire contre des pathogènes en induisant la sécrétion de cytokines et chimiokines (Basith, Manavalan et al. 2011). TLR7 est exprimé par les cellules immunitaires, les cellules épithéliales, mais également les cellules cancéreuses (Dajon, Iribarren et al. 2017). Le rôle des récepteurs TLR dans le microenvironnement est complexe avec d'un côté un rôle pro-inflammatoire lorsqu'ils sont exprimés par les cellules du système immunitaire, et d'un autre côté un rôle pro-tumoral lorsqu'ils sont exprimés par les cellules cancéreuses.

Outre les macrophages de phénotypes M2, les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs pour Myeloid-Derived Suppressor Cells) possèdent également un rôle immunosuppresseur. La présence de ces cellules dans le microenvironnement tumoral a été associée à un pronostic défavorable et à une résistance aux traitements (Gabrilovich 2017). Une étude a révélé un rôle crucial de TLR7 dans le recrutement des cellules MDSC conduisant à une accélération de la croissance tumorale et le développement de métastases lorsqu'il est exprimé par les cellules de cancer du poumon (Dajon, Iribarren et al. 2019). De plus, TLR7 a déjà été impliqué dans la

progression tumorale et la résistance au cisplatine dans un modèle de cancer de poumon (Cherfils-Vicini, Platonova et al. 2010). Jusqu'à présent, TLR7 n'a jamais été impliqué dans la croissance tumorale des cancers ORL mais sa surexpression observée dans les cellules invalidées pour TMEM45A pourrait expliquer les résultats observés.

Il serait intéressant par la suite d'étudier dans un premier temps la croissance tumorale *in vivo* des cellules RCC4 plus pVHL invalidées ou non pour TMEM45A mais également l'implication de TMEM45A dans la réponse au traitement après xénogreffes des cellules SQD9 et des cellules RCC4 plus pVHL.

En toxicologie, il est important de déterminer la dose de létalité d'un composé engendrant la mort de 10 % des individus traités (LD10). Dans la littérature, dans le cas du cisplatine, la dose utilisée est de 10 mg/kg (Fink, Zheng et al. 1997). Cependant il est possible d'augmenter le nombre d'injections en diminuant la concentration de drogue administrée tout en veillant à ne pas amplifier les effets toxiques du cisplatine sur les animaux (Chen, Han et al. 2015, Fan, Du et al. 2015, Aston, Hope et al. 2017). Nous avons effectué des études préliminaires qui ont montré qu'une injection unique de cisplatine à 10 mg/kg entrainait bien une diminution de la taille des tumeurs. Cependant, deux semaines après l'injection, la taille des tumeurs réaugmentait à nouveau. Le cisplatine a alors été administré sur trois semaines à raison de 4 mg/kg une fois par semaine, permettant ainsi une meilleure efficacité du traitement. L'étude de l'implication de TMEM45A dans la réponse au traitement pourra alors être réalisée par une xénogreffe de cellules cancéreuses invalidées ou non pour TMEM45A suivi soit d'un traitement au cisplatine à raison d'une injection à 4 mg/kg une fois par semaine sur 3 semaines, soit d'une injection d'une solution stérile de NaCl 0,9% par injection intra-péritonéale. Puis, après mesure des tumeurs et exérèse, les marqueurs de mort cellulaire par apoptose tels que la caspase 3 clivée ou bien la cytokératine 18 clivée pourront être analysés par immunomarquage (Linder, Havelka et al. 2004, Bressenot, Zimmer et al. 2009).

En conclusion, *in vivo*, la protéine TMEM45A jouerait un rôle dans la croissance tumorale via une possible modulation de la réponse immunitaire. Ainsi son absence permettrait une augmentation de la croissance des tumeurs par un échappement des cellules cancéreuses à l'infiltrat immunitaire et en particulier l'infiltrat lymphocytaire.

Conclusion générale

Les résultats obtenus durant cette thèse soulignent la complexité et l'hétérogénéité des cellules cancéreuses rendant ainsi leur étude difficile. La protéine TMEM45A, qui a été décrite comme protéine anti-apoptotique dans divers cancers, est en fait pro-apoptotique dans d'autres. De plus, au sein d'un même type de cancer, différentes tumeurs peuvent, en fonction de leur site de développement, présenter une sensibilité au cisplatine plus ou moins importante et un niveau d'expression de TMEM45A différent qui n'aura alors pas le même impact sur la réponse des cellules cancéreuses au cisplatine. Cependant, TMEM45A joue un rôle clair dans la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine.

L'étude de biomarqueurs notamment au niveau moléculaire permet d'améliorer et de personnaliser la prise en charge du patient. Durant ces dernières années, la découverte d'ADN tumoral présent dans le sang a permis l'identification de biomarqueurs relargués par les cellules cancéreuses dans la circulation sanguine et accessibles par prise de sang. Outre leur utilisation dans le développement de nouvelles thérapies, ces biomarqueurs peuvent avoir un rôle prédictif comme par exemple dans la réponse aux traitements. Il existe déjà de nombreux marqueurs tumoraux prédictifs de la résistance ou de la réponse à une thérapie ciblée et TMEM45A pourrait en faire partie.

Références

Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang and C. W. Akey (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." Mol Cell **9**(2): 423-432.

Adhim, Z., X. Lin, W. Huang, N. Morishita, T. Nakamura, H. Yasui, N. Otsuki, K. Shigemura, M. Fujisawa, K. Nibu and T. Shirakawa (2012). "E10A, an adenovirus-carrying endostatin gene, dramatically increased the tumor drug concentration of metronomic chemotherapy with low-dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous-cell carcinoma." Cancer Gene Ther **19**(2): 144-152.

Agrawal, N., M. J. Frederick, C. R. Pickering, C. Bettegowda, K. Chang, R. J. Li, C. Fakhry, T. X. Xie, J. Zhang, J. Wang, N. Zhang, A. K. El-Naggar, S. A. Jasser, J. N. Weinstein, L. Trevino, J. A. Drummond, D. M. Muzny, Y. Wu, L. D. Wood, R. H. Hruban, W. H. Westra, W. M. Koch, J. A. Califano, R. A. Gibbs, D. Sidransky, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, N. Papadopoulos, D. A. Wheeler, K. W. Kinzler and J. N. Myers (2011). "Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1." Science **333**(6046): 1154-1157.

Agulnik, M. (2012). "New approaches to EGFR inhibition for locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN)." Med Oncol **29**(4): 2481-2491.

Al-Bahlani, S., M. Fraser, A. Y. Wong, B. S. Sayan, R. Bergeron, G. Melino and B. K. Tsang (2011). "P73 regulates cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells via a calcium/calpain-dependent mechanism." Oncogene **30**(41): 4219-4230.

Al-Rawashdeh, F. Y., P. Scriven, I. C. Cameron, P. V. Vergani and L. Wyld (2010). "Unfolded protein response activation contributes to chemoresistance in hepatocellular carcinoma." Eur J Gastroenterol Hepatol **22**(9): 1099-1105.

Alberts B, J. A., Lewis J, et al (2002). "The Molecular Mechanisms of Membrane Transport and the Maintenance of Compartmental Diversity." Molecular Biology of the Cell **4th edition**.

Allan, L. A. and P. R. Clarke (2007). "Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis." Mol Cell **26**(2): 301-310.

Amarante-Mendes, G. P. and D. R. Green (1999). "The regulation of apoptotic cell death." Braz J Med Biol Res **32**(9): 1053-1061.

Appelhoff, R. J., Y. M. Tian, R. R. Raval, H. Turley, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe and J. M. Gleadle (2004). "Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor." J Biol Chem **279**(37): 38458-38465.

Argiris, A., M. V. Karamouzis, D. Raben and R. L. Ferris (2008). "Head and neck cancer." Lancet **371**(9625): 1695-1709.

Arora, K. and N. D. Riddle (2018). "Extraskeletal Mesenchymal Chondrosarcoma." Arch Pathol Lab Med **142**(11): 1421-1424.

Arts, H. J., H. Hollema, W. Lemstra, P. H. Willemse, E. G. De Vries, H. H. Kampinga and A. G. Van der Zee (1999). "Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma: relation in response to chemotherapy and prognosis." Int J Cancer **84**(3): 234-238.

Arumugam, T., V. Ramachandran, K. F. Fournier, H. Wang, L. Marquis, J. L. Abbruzzese, G. E. Gallick, C. D. Logsdon, D. J. McConkey and W. Choi (2009). "Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer." Cancer Res **69**(14): 5820-5828.

Asgari, Y., Z. Zabihinpour, A. Salehzadeh-Yazdi, F. Schreiber and A. Masoudi-Nejad (2015). "Alterations in cancer cell metabolism: the Warburg effect and metabolic adaptation." Genomics **105**(5-6): 275-281.

Aston, W. J., D. E. Hope, A. K. Nowak, B. W. Robinson, R. A. Lake and W. J. Lesterhuis (2017). "A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice." BMC Cancer **17**(1): 684.

Atala, A. (2018). "Re: Analysis of Renal Cancer Cell Lines from Two Major Resources Enables Genomics-Guided Cell Line Selection." J Urol **199**(2): 346.

Babicki, S., D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J. R. Grant, A. Maciejewski and D. S. Wishart (2016). "Heatmapper: web-enabled heat mapping for all." Nucleic Acids Res **44**(W1): W147-153.

Bao, Q. and Y. Shi (2007). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." Cell Death Differ **14**(1): 56-65.

Barak, Y., T. Juven, R. Haffner and M. Oren (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." EMBO J **12**(2): 461-468.

Barrett, J. C. and R. W. Wiseman (1987). "Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment." Environ Health Perspect **76**: 65-70.

Basith, S., B. Manavalan, G. Lee, S. G. Kim and S. Choi (2011). "Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010)." Expert Opin Ther Pat **21**(6): 927-944.

Basu, A. and S. Krishnamurthy (2010). "Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage." J Nucleic Acids **2010**.

Battelli, C. and D. C. Cho (2011). "mTOR inhibitors in renal cell carcinoma." Therapy **8**(4): 359-367.

Beavon, I. R. (1999). "Regulation of E-cadherin: does hypoxia initiate the metastatic cascade?" Mol Pathol **52**(4): 179-188.

Belfi, C. A., S. Chatterjee, D. M. Gosky, S. J. Berger and N. A. Berger (1999). "Increased sensitivity of human colon cancer cells to DNA cross-linking agents after GRP78 up-regulation." Biochem Biophys Res Commun **257**(2): 361-368.

Benita, Y., H. Kikuchi, A. D. Smith, M. Q. Zhang, D. C. Chung and R. J. Xavier (2009). "An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia." Nucleic Acids Res **37**(14): 4587-4602.

Beretta, G. L., V. Benedetti, G. Cossa, Y. G. Assaraf, E. Bram, L. Gatti, E. Corna, N. Carenini, D. Colangelo, S. B. Howell, F. Zunino and P. Perego (2010). "Increased levels and defective glycosylation of MRPs in ovarian carcinoma cells resistant to oxaliplatin." Biochem Pharmacol **79**(8): 1108-1117.

Bergers, G. and S. Song (2005). "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance." Neuro Oncol **7**(4): 452-464.

Berra, E., E. Benizri, A. Ginouves, V. Volmat, D. Roux and J. Pouyssegur (2003). "HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia." EMBO J **22**(16): 4082-4090.

Brands, R. C., U. D. Muller-Richter, F. De Donno, A. Seher, G. Mutzbauer, C. Linz, A. C. Kubler and S. Hartmann (2016). "Co-treatment of wild-type EGFR head and neck cancer cell lines with afatinib and cisplatin." Mol Med Rep **13**(3): 2338-2344.

Bravo, R., V. Parra, D. Gatica, A. E. Rodriguez, N. Torrealba, F. Paredes, Z. V. Wang, A. Zorzano, J. A. Hill, E. Jaimovich, A. F. Quest and S. Lavandero (2013). "Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration." Int Rev Cell Mol Biol **301**: 215-290.

Brenner, B. M. (1985). "Nephron adaptation to renal injury or ablation." Am J Physiol **249**(3 Pt 2): F324-337.

Bressenot, A., O. Zimmer, S. Marchal, G. Gauchotte, K. Montagne and F. Plenat (2009). "[Detection of apoptosis in vivo: comparison of different methods in histological sections of subcutaneous xenografts of HT29 human colon adenocarcinoma]." Ann Pathol **29**(5): 370-375.

Brodaczewska, K. K., C. Szczylik, M. Fiedorowicz, C. Porta and A. M. Czarnecka (2016). "Choosing the right cell line for renal cell cancer research." Mol Cancer **15**(1): 83.

Brozovic, A., G. Fritz, M. Christmann, J. Zisowsky, U. Jaehde, M. Osmak and B. Kaina (2004). "Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance." Int J Cancer **112**(6): 974-985.

Brozovic, A., S. Simaga and M. Osmak (2001). "Induction of heat shock protein 70 in drug-resistant cells by anticancer drugs and hyperthermia." Neoplasma **48**(2): 99-103.

Brugarolas, J. (2013). "PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma." Cancer J **19**(4): 324-332.

Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa and D. J. Chen (2001). "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." J Biol Chem **276**(45): 42462-42467.

Cai, J., H. Tang, L. Xu, X. Wang, C. Yang, S. Ruan, J. Guo, S. Hu and Z. Wang (2012). "Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness." Carcinogenesis **33**(1): 20-29.

Cairns, P. (2010). "Renal cell carcinoma." Cancer Biomark **9**(1-6): 461-473.

Campeau, P. M., W. D. Foulkes and M. D. Tischkowitz (2008). "Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues." Hum Genet **124**(1): 31-42.

Cancer Genome Atlas, N. (2015). "Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas." Nature **517**(7536): 576-582.

Cancer Genome Atlas Research, N. (2013). "Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma." Nature **499**(7456): 43-49.

Capitanio, U. and F. Montorsi (2016). "Renal cancer." Lancet **387**(10021): 894-906.

Chabner, B. A. and T. G. Roberts, Jr. (2005). "Timeline: Chemotherapy and the war on cancer." Nat Rev Cancer **5**(1): 65-72.

Chaitanya, G. V., A. J. Steven and P. P. Babu (2010). "PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration." Cell Commun Signal **8**: 31.

Chang, F., S. Syrjanen, A. Tervahauta, K. Kurvinen, L. Wang and K. Syrjanen (1994). "Frequent mutations of p53 gene in oesophageal squamous cell carcinomas with and without human papillomavirus (HPV) involvement suggest the dominant role of environmental carcinogens in oesophageal carcinogenesis." Br J Cancer **70**(2): 346-351.

Chen, D. J. and C. S. Nirodi (2007). "The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage." Clin Cancer Res **13**(22 Pt 1): 6555-6560.

Chen, D. S., B. A. Irving and F. S. Hodi (2012). "Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1." Clin Cancer Res **18**(24): 6580-6587.

Chen, H. H., I. S. Song, A. Hossain, M. K. Choi, Y. Yamane, Z. D. Liang, J. Lu, L. Y. Wu, Z. H. Siddik, L. W. Klomp, N. Savaraj and M. T. Kuo (2008). "Elevated glutathione levels confer cellular sensitization to cisplatin toxicity by up-regulation of copper transporter hCtr1." Mol Pharmacol **74**(3): 697-704.

Chen, M., Y. Ye, H. Yang, P. Tamboli, S. Matin, N. M. Tannir, C. G. Wood, J. Gu and X. Wu (2009). "Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using high-density single nucleotide polymorphism arrays." Int J Cancer **125**(10): 2342-2348.

Chen, R., R. Y. Dai, C. Y. Duan, Y. P. Liu, S. K. Chen, D. M. Yan, C. N. Chen, M. Wei and H. Li (2011). "Unfolded protein response suppresses cisplatin-induced apoptosis via autophagy regulation in human hepatocellular carcinoma cells." Folia Biol (Praha) **57**(3): 87-95.

Chen, S., J. Z. Chen, J. Q. Zhang, H. X. Chen, M. L. Yan, L. Huang, Y. F. Tian, Y. L. Chen and Y. D. Wang (2016). "Hypoxia induces TWIST-activated epithelial-mesenchymal transition and proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in nude mice." Cancer Lett **383**(1): 73-84.

Chen, Y., F. Han, L. H. Cao, C. Li, J. W. Wang, Q. Li, W. Zheng, Z. X. Guo, A. H. Li and J. H. Zhou (2015). "Dose-response relationship in cisplatin-treated breast cancer xenografts monitored with dynamic contrast-enhanced ultrasound." BMC Cancer **15**: 136.

Chen, Y. C., C. C. Kuo, C. F. Chian, C. Tzao, S. Y. Chang, Y. L. Shih, Y. W. Lin, M. H. Yu and H. Y. Su (2018). "Knockdown of POLDIP2 suppresses tumor growth and invasion capacity and is linked to unfavorable transformation ability and metastatic feature in non-small cell lung cancer." Exp Cell Res **368**(1): 42-49.

Cherfils-Vicini, J., S. Platonova, M. Gillard, L. Laurans, P. Validire, R. Caliandro, P. Magdeleinat, F. Mami-Chouaib, M. C. Dieu-Nosjean, W. H. Fridman, D. Damotte, C. Sautes-Fridman and I. Cremer (2010). "Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance." J Clin Invest **120**(4): 1285-1297.

Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari and V. M. Dixit (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-512.

Chung, C. H., V. B. Guthrie, D. L. Masica, C. Tokheim, H. Kang, J. Richmon, N. Agrawal, C. Fakhry, H. Quon, R. M. Subramaniam, Z. Zuo, T. Seiwert, Z. R. Chalmers, G. M. Frampton, S. M. Ali, R. Yelensky, P. J. Stephens, V. A. Miller, R. Karchin and J. A. Bishop (2015). "Genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma determined by cancer gene-targeted sequencing." Ann Oncol **26**(6): 1216-1223.

Cook, P. J., B. G. Ju, F. Telese, X. Wang, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (2009). "Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions." Nature **458**(7238): 591-596.

Corbet, C. and O. Feron (2017). "Emerging roles of lipid metabolism in cancer progression." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **20**(4): 254-260.

Cosse, J. P. and C. Michiels (2008). "Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression." Anticancer Agents Med Chem **8**(7): 790-797.

Crijns, A. P., R. S. Fehrmann, S. de Jong, F. Gerbens, G. J. Meersma, H. G. Klip, H. Hollema, R. M. Hofstra, G. J. te Meerman, E. G. de Vries and A. G. van der Zee (2009). "Survival-related profile, pathways, and transcription factors in ovarian cancer." PLoS Med **6**(2): e24.

Cui, X. S., Y. J. Jeong, H. Y. Lee, S. H. Cheon and N. H. Kim (2004). "Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing in vitro." Reproduction **127**(1): 125-130.

Currie, E., A. Schulze, R. Zechner, T. C. Walther and R. V. Farese, Jr. (2013). "Cellular fatty acid metabolism and cancer." Cell Metab **18**(2): 153-161.

Dagher, J. (2015). "Étude du profil histologique et moléculaire des carcinomes rénaux à cellules claires et leurs métastases." Morphologie **99**(327): 167.

Dajon, M., K. Iribarren and I. Cremer (2017). "Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword." Immunobiology **222**(1): 89-100.

Dajon, M., K. Iribarren, F. Petitprez, S. Marmier, A. Lupo, M. Gillard, H. Ouakrim, N. Victor, D. B. Vincenzo, P. E. Joubert, O. Kepp, G. Kroemer, M. Alifano, D. Damotte and I. Cremer (2019). "Toll like receptor 7 expressed by malignant cells promotes tumor progression and metastasis through the recruitment of myeloid derived suppressor cells." Oncoimmunology **8**(1): e1505174.

Damia, G., L. Filiberti, F. Vikhanskaya, L. Carrassa, Y. Taya, M. D'Incalci and M. Broggini (2001). "Cisplatinum and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation." Neoplasia **3**(1): 10-16.

Dasari, S. and P. B. Tchounwou (2014). "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action." Eur J Pharmacol **740**: 364-378.

Davis, C. F., C. J. Ricketts, M. Wang, L. Yang, A. D. Cherniack, H. Shen, C. Buhay, H. Kang, S. C. Kim, C. C. Fahey, K. E. Hacker, G. Bhanot, D. A. Gordenin, A. Chu, P. H. Gunaratne, M. Biehl, S. Seth, B. A. Kaipparettu, C. A. Bristow, L. A. Donehower, E. M. Wallen, A. B. Smith, S. K. Tickoo, P. Tamboli, V. Reuter, L. S. Schmidt, J. J. Hsieh, T. K. Choueiri, A. A. Hakimi, N. The Cancer Genome Atlas Research, L. Chin, M. Meyerson, R. Kucherlapati, W. Y. Park, A. G. Robertson, P. W. Laird, E. P. Henske, D. J. Kwiatkowski, P. J. Park, M. Morgan, B. Shuch, D. Muzny, D. A. Wheeler, W. M. Linehan, R. A. Gibbs, W. K. Rathmell and C. J. Creighton (2014). "The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma." Cancer Cell **26**(3): 319-330.

Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." Cell **103**(2): 239-252.

De Pascali, S. A., P. Papadia, S. Capoccia, L. Marchio, M. Lanfranchi, A. Ciccarese and F. P. Fanizzi (2009). "Hard/soft selectivity in ligand substitution reactions of beta-diketonate platinum(II) complexes." Dalton Trans(37): 7786-7795.

Delahunt, B., P. B. Bethwaite and J. N. Nacey (2007). "Outcome prediction for renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors for tumours divided according to histological subtype." Pathology **39**(5): 459-465.

Delahunt, B. and J. N. Eble (1997). "Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors." Mod Pathol **10**(6): 537-544.

Ding, Z., X. Yang, A. Pater and S. C. Tang (2000). "Resistance to apoptosis is correlated with the reduced caspase-3 activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells." Biochem Biophys Res Commun **270**(2): 415-420.

Drablos, F., E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbo, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Pena-Diaz, M. Otterlei, G. Slupphaug and H. E. Krokan (2004). "Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance." DNA Repair (Amst) **3**(11): 1389-1407.

Drayton, R. M. (2012). "The role of microRNA in the response to cisplatin treatment." Biochem Soc Trans **40**(4): 821-825.

Duan, H. and V. M. Dixit (1997). "RAIDD is a new 'death' adaptor molecule." Nature **385**(6611): 86-89.

Eales, K. L., K. E. Hollinshead and D. A. Tennant (2016). "Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells." Oncogenesis **5**: e190.

Eastman, A. (1987). "The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes." Pharmacol Ther **34**(2): 155-166.

el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-825.

el-Khateeb, M., T. G. Appleton, L. R. Gahan, B. G. Charles, S. J. Berners-Price and A. M. Bolton (1999). "Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques." J Inorg Biochem **77**(1-2): 13-21.

Elliott, M. R. and K. S. Ravichandran (2010). "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease." J Cell Biol **189**(7): 1059-1070.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Erler, J. T., C. J. Cawthorne, K. J. Williams, M. Koritzinsky, B. G. Wouters, C. Wilson, C. Miller, C. Demonacos, I. J. Stratford and C. Dive (2004). "Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance." Mol Cell Biol **24**(7): 2875-2889.

Erovic, B. M., M. Pelzmann, M. Grasl, J. Pammer, G. Kornek, W. Brannath, E. Selzer and D. Thurnher (2005). "Mcl-1, vascular endothelial growth factor-R2, and 14-3-3sigma expression might predict primary response against radiotherapy and chemotherapy in patients with locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck." Clin Cancer Res **11**(24 Pt 1): 8632-8636.

Fakhry, C. and M. L. Gillison (2006). "Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers." J Clin Oncol **24**(17): 2606-2611.

Fan, J., J. Du, J. Wu, S. Fu, D. Hu and Q. Wan (2015). "Antitumor effects of different administration sequences of cisplatin and Endostar on Lewis lung carcinoma." Oncol Lett **9**(2): 822-828.

Fan, S., M. L. Smith, D. J. Rivet, 2nd, D. Duba, Q. Zhan, K. W. Kohn, A. J. Fornace, Jr. and P. M. O'Connor (1995). "Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline." Cancer Res **55**(8): 1649-1654.

Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.

Feron, O. (2009). "Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells." Radiother Oncol **92**(3): 329-333.

Ferrari, A., I. Sultan, T. T. Huang, C. Rodriguez-Galindo, A. Shehadeh, C. Meazza, K. K. Ness, M. Casanova and S. L. Spunt (2011). "Soft tissue sarcoma across the age spectrum: a population-based study from the Surveillance Epidemiology and End Results database." Pediatr Blood Cancer **57**(6): 943-949.

Ferris, R. L., G. Blumenschein, Jr., J. Fayette, J. Guigay, A. D. Colevas, L. Licitra, K. Harrington, S. Kasper, E. E. Vokes, C. Even, F. Worden, N. F. Saba, L. C. Iglesias Docampo, R. Haddad, T. Rordorf, N. Kiyota, M. Tahara, M. Monga, M. Lynch, W. J. Geese, J. Kopit, J. W. Shaw and M. L. Gillison (2016). "Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck." N Engl J Med **375**(19): 1856-1867.

Ferry, K. V., T. C. Hamilton and S. W. Johnson (2000). "Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF." Biochem Pharmacol **60**(9): 1305-1313.

Filipits, M., V. Haddad, K. Schmid, A. Huynh, A. Dunant, F. Andre, E. Brambilla, R. Stahel, J. P. Pignon, J. C. Soria, H. H. Popper, T. Le Chevalier and R. Pirker (2007). "Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program." Clin Cancer Res **13**(13): 3892-3898.

Fink, D., H. Zheng, S. Nebel, P. S. Norris, S. Aebi, T. P. Lin, A. Nehme, R. D. Christen, M. Haas, C. L. MacLeod and S. B. Howell (1997). "In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair." Cancer Res **57**(10): 1841-1845.

Flamant, L., E. Roegiers, M. Pierre, A. Hayez, C. Sterpin, O. De Backer, T. Arnould, Y. Poumay and C. Michiels (2012). "TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells." BMC Cancer **12**: 391.

Fong, G. H. and K. Takeda (2008). "Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins." Cell Death Differ **15**(4): 635-641.

Forster, M. D. and M. J. Devlin (2018). "Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer." Front Oncol **8**: 310.

Fu, D., J. A. Calvo and L. D. Samson (2012). "Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents." Nat Rev Cancer **12**(2): 104-120.

Fulda, S., A. M. Gorman, O. Hori and A. Samali (2010). "Cellular stress responses: cell survival and cell death." Int J Cell Biol **2010**: 214074.

Gabrilovich, D. I. (2017). "Myeloid-Derived Suppressor Cells." Cancer Immunol Res **5**(1): 3-8.

Gadducci, A., S. Cosio, S. Muraca and A. R. Genazzani (2002). "Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications." Eur J Gynaecol Oncol **23**(5): 390-396.

Galluzzi, L., L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo and G. Kroemer (2012). "Molecular mechanisms of cisplatin resistance." Oncogene **31**(15): 1869-1883.

Gaykalova, D. A., E. Mambo, A. Choudhary, J. Houghton, K. Buddavarapu, T. Sanford, W. Darden, A. Adai, A. Hadd, G. Latham, L. V. Danilova, J. Bishop, R. J. Li, W. H. Westra, P. Hennessey, W. M. Koch, M. F. Ochs, J. A. Califano and W. Sun (2014). "Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma." PLoS One **9**(3): e93102.

Genadry, K. C., S. Pietrobono, R. Rota and C. M. Linardic (2018). "Soft Tissue Sarcoma Cancer Stem Cells: An Overview." Front Oncol **8**: 475.

Genard, G., A. C. Wera, C. Huart, B. Le Calve, S. Penninckx, A. Fattaccioli, T. Tabarrant, C. Demazy, N. Ninane, A. C. Heuskin, S. Lucas and C. Michiels (2018). "Proton irradiation orchestrates macrophage reprogramming through NFkappaB signaling." Cell Death Dis **9**(7): 728.

Gerber, P. A., B. A. Buhren, H. Schrumpf, B. Homey, A. Zlotnik and P. Hevezi (2014). "The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes." Biol Chem **395**(6): 577-591.

Gharbi-Ayachi, A., J. C. Labbe, A. Burgess, S. Vigneron, J. M. Strub, E. Brioudes, A. Van-Dorsselaer, A. Castro and T. Lorca (2010). "The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A." Science **330**(6011): 1673-1677.

Ghidini, M., F. Petrelli, A. Ghidini, G. Tomasello, J. C. Hahne, R. Passalacqua and S. Barni (2017). "Clinical development of mTor inhibitors for renal cancer." Expert Opin Investig Drugs **26**(11): 1229-1237.

Gillet, J. P. and M. M. Gottesman (2010). "Mechanisms of multidrug resistance in cancer." Methods Mol Biol **596**: 47-76.

Gnarra, J. R., K. Tory, Y. Weng, L. Schmidt, M. H. Wei, H. Li, F. Latif, S. Liu, F. Chen, F. M. Duh and et al. (1994). "Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma." Nat Genet **7**(1): 85-90.

Gocheva, V., H. W. Wang, B. B. Gadea, T. Shree, K. E. Hunter, A. L. Garfall, T. Berman and J. A. Joyce (2010). "IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion." Genes Dev **24**(3): 241-255.

Goldberg, M. A., S. P. Dunning and H. F. Bunn (1988). "Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein." Science **242**(4884): 1412-1415.

Gottesman, M. M., T. Fojo and S. E. Bates (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." Nat Rev Cancer **2**(1): 48-58.

Gottesman, M. M., Lavi, O., Hall, M. D., and Gillet, J. P. (2016) Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. Annu Rev Pharmacol Toxicol 56, 85-102

Grandis, J. R. and D. J. Tweardy (1993). "Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer." Cancer Res **53**(15): 3579-3584.

Guilliam, T. A., L. J. Bailey, N. C. Brissett and A. J. Doherty (2016). "PolDIP2 interacts with human PrimPol and enhances its DNA polymerase activities." Nucleic Acids Res **44**(7): 3317-3329.

Guo, G., Y. Gui, S. Gao, A. Tang, X. Hu, Y. Huang, W. Jia, Z. Li, M. He, L. Sun, P. Song, X. Sun, X. Zhao, S. Yang, C. Liang, S. Wan, F. Zhou, C. Chen, J. Zhu, X. Li, M. Jian, L. Zhou, R. Ye, P. Huang, J. Chen, T. Jiang, X. Liu, Y. Wang, J. Zou, Z. Jiang, R. Wu, S. Wu, F. Fan, Z. Zhang, L. Liu, R. Yang, X. Liu, H. Wu, W. Yin, X. Zhao, Y. Liu, H. Peng, B. Jiang, Q. Feng, C. Li, J. Xie, J. Lu, K. Kristiansen, Y. Li, X. Zhang, S. Li, J. Wang, H. Yang, Z. Cai and J. Wang (2011). "Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma." Nat Genet **44**(1): 17-19.

Guo, J., L. Chen, N. Luo, W. Yang, X. Qu and Z. Cheng (2015). "Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells." Oncol Rep **33**(6): 3124-3130.

Hall, M. D., M. Okabe, D. W. Shen, X. J. Liang and M. M. Gottesman (2008). "The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 495-535.

Hamaguchi, K., A. K. Godwin, M. Yakushiji, P. J. O'Dwyer, R. F. Ozols and T. C. Hamilton (1993). "Cross-resistance to diverse drugs is associated with primary cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines." Cancer Res **53**(21): 5225-5232.

Han, J. Y., E. K. Hong, B. G. Choi, J. N. Park, K. W. Kim, J. H. Kang, J. Y. Jin, S. Y. Park, Y. S. Hong and K. S. Lee (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." Med Oncol **20**(4): 355-362.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hanahan, D., and Coussens, L. M. (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell **21**, 309-322

Harding, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden and D. Ron (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-633.

Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." Nat Rev Cancer **2**(1): 38-47.

Hartlerode, A. J. and R. Scully (2009). "Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells." Biochem J **423**(2): 157-168.

Hatai, T., A. Matsuzawa, S. Inoshita, Y. Mochida, T. Kuroda, K. Sakamaki, K. Kuida, S. Yonehara, H. Ichijo and K. Takeda (2000). "Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation." J Biol Chem **275**(34): 26576-26581.

Hawkins, D. S., G. W. Demers and D. A. Galloway (1996). "Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents." Cancer Res **56**(4): 892-898.

Hayez, A., J. Malaisse, E. Roegiers, M. Reynier, C. Renard, M. Haftek, V. Geenen, G. Serre, M. Simon, C. L. de Rouvroit, C. Michiels and Y. Poumay (2014). "High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization." Exp Dermatol **23**(5): 339-344.

Hayez, A., E. Roegiers, J. Malaisse, B. Balau, C. Sterpin, Y. Achouri, C. L. De Rouvroit, Y. Poumay, C. Michiels and O. De Backer (2016). "TMEM45A Is Dispensable for Epidermal Morphogenesis, Keratinization and Barrier Formation." PLoS One **11**(1): e0147069.

Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **10**(11): 3787-3799.

Heistad, D. D. and F. M. Abboud (1980). "Dickinson W. Richards Lecture: Circulatory adjustments to hypoxia." Circulation **61**(3): 463-470.

Herman, J. G., F. Latif, Y. Weng, M. I. Lerman, B. Zbar, S. Liu, D. Samid, D. S. Duan, J. R. Gnarra, W. M. Linehan and et al. (1994). "Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9700-9704.

Herren, B., B. Levkau, E. W. Raines and R. Ross (1998). "Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases." Mol Biol Cell **9**(6): 1589-1601.

Hirano, G., H. Izumi, A. Kidani, Y. Yasuniwa, B. Han, H. Kusaba, K. Akashi, M. Kuwano and K. Kohno (2010). "Enhanced expression of PCAF endows apoptosis resistance in cisplatin-resistant cells." Mol Cancer Res **8**(6): 864-872.

Hoesel, B. and J. A. Schmid (2013). "The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer." Mol Cancer **12**: 86.

Holzer, A. K., G. H. Manorek and S. B. Howell (2006). "Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin." Mol Pharmacol **70**(4): 1390-1394.

Hsieh, J. J., M. P. Purdue, S. Signoretti, C. Swanton, L. Albiges, M. Schmidinger, D. Y. Heng, J. Larkin and V. Ficarra (2017). "Renal cell carcinoma." Nat Rev Dis Primers **3**: 17009.

Hsu, D. S., H. Y. Lan, C. H. Huang, S. K. Tai, S. Y. Chang, T. L. Tsai, C. C. Chang, C. H. Tzeng, K. J. Wu, J. Y. Kao and M. H. Yang (2010). "Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer." Clin Cancer Res **16**(18): 4561-4571.

Huang, S. M., J. M. Bock and P. M. Harari (1999). "Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck." Cancer Res **59**(8): 1935-1940.

Huang, S. M. and P. M. Harari (2000). "Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis." Clin Cancer Res **6**(6): 2166-2174.

Huang, W., Y. Liu, J. Wang, X. Yuan, H. W. Jin, L. R. Zhang, J. T. Zhang, Z. M. Liu and J. R. Cui (2018). "Small-molecule compounds targeting the STAT3 DNA-binding domain suppress survival of cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by inducing apoptosis." Eur J Med Chem **157**: 887-897.

Hudson, L. G., J. M. Gale, R. S. Padilla, G. Pickett, B. E. Alexander, J. Wang and D. F. Kusewitt (2010). "Microarray analysis of cutaneous squamous cell carcinomas reveals enhanced expression of epidermal differentiation complex genes." Mol Carcinog **49**(7): 619-629.

Huynh, M. L., V. A. Fadok and P. M. Henson (2002). "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation." J Clin Invest **109**(1): 41-50.

Ikeguchi, M. and N. Kaibara (2001). "Changes in survivin messenger RNA level during cisplatin treatment in gastric cancer." Int J Mol Med **8**(6): 661-666.

Irwin, M. S. (2004). "Family feud in chemosensitvity: p73 and mutant p53." Cell Cycle **3**(3): 319-323.

Irwin, M. S., K. Kondo, M. C. Marin, L. S. Cheng, W. C. Hahn and W. G. Kaelin, Jr. (2003). "Chemosensitivity linked to p73 function." Cancer Cell **3**(4): 403-410.

Ishida, S., J. Lee, D. J. Thiele and I. Herskowitz (2002). "Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14298-14302.

Ishida, S., F. McCormick, K. Smith-McCune and D. Hanahan (2010). "Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator." Cancer Cell **17**(6): 574-583.

Jackute, J., M. Zemaitis, D. Pranys, B. Sitkauskiene, S. Miliauskas, S. Vaitkiene and R. Sakalauskas (2018). "Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer." BMC Immunol **19**(1): 3.

Jasperson, K. W., T. M. Tuohy, D. W. Neklason and R. W. Burt (2010). "Hereditary and familial colon cancer." Gastroenterology **138**(6): 2044-2058.

Jiang, Y., W. Zhang, K. Kondo, J. M. Klco, T. B. St Martin, M. R. Dufault, S. L. Madden, W. G. Kaelin, Jr. and M. Nacht (2003). "Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways." Mol Cancer Res **1**(6): 453-462.

Johnson, S. W., D. Shen, I. Pastan, M. M. Gottesman and T. C. Hamilton (1996). "Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell lines." Exp Cell Res **226**(1): 133-139.

Johnstone, T. C., K. Suntharalingam and S. J. Lippard (2015). "Third row transition metals for the treatment of cancer." Philos Trans A Math Phys Eng Sci **373**(2037).

Jungmann, J., H. A. Reins, J. Lee, A. Romeo, R. Hassett, D. Kosman and S. Jentsch (1993). "MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast." EMBO J **12**(13): 5051-5056.

Junttila, M. R. and F. J. de Sauvage (2013). "Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response." Nature **501**(7467): 346-354.

Karczmarek-Borowska, B., A. Filip, J. Wojcierowski, A. Smolen, I. Pilecka and A. Jablonka (2005). "Survivin antiapoptotic gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer: in situ hybridization study." Folia Histochem Cytobiol **43**(4): 237-242.

Kastan, M. B., Q. Zhan, W. S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W. V. Walsh, B. S. Plunkett, B. Vogelstein and A. J. Fornace, Jr. (1992). "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia." Cell **71**(4): 587-597.

Katano, K., A. Kondo, R. Safaei, A. Holzer, G. Samimi, M. Mishima, Y. M. Kuo, M. Rochdi and S. B. Howell (2002). "Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper." Cancer Res **62**(22): 6559-6565.

Kato, J., Y. Kuwabara, M. Mitani, N. Shinoda, A. Sato, T. Toyama, A. Mitsui, T. Nishiwaki, S. Moriyama, J. Kudo and Y. Fujii (2001). "Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy." Int J Cancer **95**(2): 92-95.

Ke, Q. and M. Costa (2006). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)." Mol Pharmacol **70**(5): 1469-1480.

Kelland, L. (2007). "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy." Nat Rev Cancer **7**(8): 573-584.

Kelland, L. R. (1993). "New platinum antitumor complexes." Crit Rev Oncol Hematol **15**(3): 191-219.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer and M. E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." EMBO J **14**(22): 5579-5588.

Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott and A. Ashkenazi (2001). "Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8." J Biol Chem **276**(49): 46639-46646.

Komiya, S., M. C. Gebhardt, D. C. Mangham and A. Inoue (1998). "Role of glutathione in cisplatin resistance in osteosarcoma cell lines." J Orthop Res **16**(1): 15-22.

Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Koths, D. J. Kwiatkowski and L. T. Williams (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." Science **278**(5336): 294-298.

Krammer, P. H., R. Arnold and I. N. Lavrik (2007). "Life and death in peripheral T cells." Nat Rev Immunol **7**(7): 532-542.

Kreimer, A. R., G. M. Clifford, P. Boyle and S. Franceschi (2005). "Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(2): 467-475.

Krigsfeld, G. S. and C. H. Chung (2015). "Novel targets in head and neck cancer: should we be optimistic?" Clin Cancer Res **21**(3): 495-497.

Kubbutat, M. H., S. N. Jones and K. H. Vousden (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature **387**(6630): 299-303.

Kuo, M. T. (2009). "Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." Antioxid Redox Signal **11**(1): 99-133.

Kurokawa, M. and S. Kornbluth (2009). "Caspases and kinases in a death grip." Cell **138**(5): 838-854.

Lambert, S. R., N. Mladkova, A. Gulati, R. Hamoudi, K. Purdie, R. Cerio, I. Leigh, C. Proby and C. A. Harwood (2014). "Key differences identified between actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma by transcriptome profiling." Br J Cancer **110**(2): 520-529.

Lavrik, I., A. Golks and P. H. Krammer (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci **118**(Pt 2): 265-267.

Lebwohl, D. and R. Canetta (1998). "Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update." Eur J Cancer **34**(10): 1522-1534.

Lee, J. G. and R. Wu (2015). "Erlotinib-cisplatin combination inhibits growth and angiogenesis through c-MYC and HIF-1alpha in EGFR-mutated lung cancer in vitro and in vivo." Neoplasia **17**(2): 190-200.

Lee, S., S. Stewart, I. Nagtegaal, J. Luo, Y. Wu, G. Colditz, D. Medina and D. C. Allred (2012). "Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer." Cancer Res **72**(17): 4574-4586.

Lee, S. Y., J. S. Cho, D. Y. Yuk, D. C. Moon, J. K. Jung, H. S. Yoo, Y. M. Lee, S. B. Han, K. W. Oh and J. T. Hong (2009). "Obovatol enhances docetaxel-induced prostate and colon cancer cell death through inactivation of nuclear transcription factor-kappaB." J Pharmacol Sci **111**(2): 124-136.

Legrand, A. J., S. Choul-Li, C. Spriet, T. Idziorek, D. Vicogne, H. Drobecq, F. Dantzer, V. Villeret and M. Aumercier (2013). "The level of Ets-1 protein is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in cancer cells to prevent DNA damage." PLoS One **8**(2): e55883.

Lei, C., Y. Wang, Y. Huang, H. Yu, Y. Huang, L. Wu and L. Huang (2012). "Up-regulated miR155 reverses the epithelial-mesenchymal transition induced by EGF and increases chemo-sensitivity to cisplatin in human Caski cervical cancer cells." PLoS One **7**(12): e52310.

Leslie, E. M., K. Ito, P. Upadhyaya, S. S. Hecht, R. G. Deeley and S. P. Cole (2001). "Transport of the beta -O-glucuronide conjugate of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog." J Biol Chem **276**(30): 27846-27854.

Li, H., J. S. Wawrose, W. E. Gooding, L. A. Garraway, V. W. Lui, N. D. Peyser and J. R. Grandis (2014). "Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection." Mol Cancer Res **12**(4): 571-582.

Li, W., L. Wan, L. Y. Zhai and J. Wang (2014). "Effects of SC-560 in combination with cisplatin or taxol on angiogenesis in human ovarian cancer xenografts." Int J Mol Sci **15**(10): 19265-19280.

Li, X. X., H. S. Zhang, Y. M. Xu, R. J. Zhang, Y. Chen, L. Fan, Y. Q. Qin, Y. Liu, M. Li and J. Fang (2017). "Knockdown of IRE1alpha inhibits colonic tumorigenesis through decreasing beta-catenin and IRE1alpha targeting suppresses colon cancer cells." Oncogene **36**(48): 6738-6746.

Liang, X. J., T. Finkel, D. W. Shen, J. J. Yin, A. Aszalos and M. M. Gottesman (2008). "SIRT1 contributes in part to cisplatin resistance in cancer cells by altering mitochondrial metabolism." Mol Cancer Res **6**(9): 1499-1506.

Liang, X. J., D. W. Shen, S. Garfield and M. M. Gottesman (2003). "Mislocalization of membrane proteins associated with multidrug resistance in cisplatin-resistant cancer cell lines." Cancer Res **63**(18): 5909-5916.

Lichner, Z., C. Saleh, V. Subramaniam, A. Seivwright, G. J. Prud'homme and G. M. Yousef (2015). "miR-17 inhibition enhances the formation of kidney cancer spheres with stem cell/ tumor initiating cell properties." Oncotarget **6**(8): 5567-5581.

Lieber, M. R. (2010). "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway." Annu Rev Biochem **79**: 181-211.

Lieberthal, W. and J. S. Levine (2009). "The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease." J Am Soc Nephrol **20**(12): 2493-2502.

Linder, S., A. M. Havelka, T. Ueno and M. C. Shoshan (2004). "Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker." Cancer Lett **214**(1): 1-9.

Linehan, W. M. (2012). "Genetic basis of kidney cancer: role of genomics for the development of disease-based therapeutics." Genome Res **22**(11): 2089-2100.

Liu, J. R., A. W. Opipari, L. Tan, Y. Jiang, Y. Zhang, H. Tang and G. Nunez (2002). "Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance." Cancer Res **62**(3): 924-931.

Llanos, S. and M. Serrano (2010). "Depletion of ribosomal protein L37 occurs in response to DNA damage and activates p53 through the L11/MDM2 pathway." Cell Cycle **9**(19): 4005-4012.

Longton, E., K. Schmit, M. Fransolet, F. Clement and C. Michiels (2018). "Appropriate Sequence for Afatinib and Cisplatin Combination Improves Anticancer Activity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." Front Oncol **8**: 432.

Lowe, S. W., H. E. Ruley, T. Jacks and D. E. Housman (1993). "p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents." Cell **74**(6): 957-967.

Lu, B. and O. J. Finn (2008). "T-cell death and cancer immune tolerance." Cell Death Differ **15**(1): 70-79.

Macha, M. A., S. Rachagani, A. K. Qazi, R. Jahan, S. Gupta, A. Patel, P. Seshacharyulu, C. Lin, S. Li, S. Wang, V. Verma, S. Kishida, M. Kishida, N. Nakamura, T. Kibe, W. M. Lydiatt, R. B. Smith, A. K. Ganti, D. T. Jones, S. K. Batra and M. Jain (2017). "Afatinib radiosensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting cancer stem cells." Oncotarget **8**(13): 20961-20973.

MacKenzie, S. H. and A. C. Clark (2012). "Death by caspase dimerization." Adv Exp Med Biol **747**: 55-73.

Mahon, P. C., K. Hirota and G. L. Semenza (2001). "FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity." Genes Dev **15**(20): 2675-2686.

Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**(1): 3-15.

Manawapat-Klopfer, A., L. T. Thomsen, P. Martus, C. Munk, R. Russ, H. Gmuender, K. Frederiksen, J. Haedicke-Jarboui, F. Stubenrauch, S. K. Kjaer and T. Iftner (2016). "TMEM45A, SERPINB5 and p16INK4A transcript levels are predictive for development of high-grade cervical lesions." Am J Cancer Res **6**(7): 1524-1536.

Mandic, A., J. Hansson, S. Linder and M. C. Shoshan (2003). "Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling." J Biol Chem **278**(11): 9100-9106.

Mandic, A., K. Viktorsson, M. Molin, G. Akusjarvi, H. Eguchi, S. I. Hayashi, M. Toi, J. Hansson, S. Linder and M. C. Shoshan (2001). "Cisplatin induces the proapoptotic conformation of Bak in a deltaMEKK1-dependent manner." Mol Cell Biol **21**(11): 3684-3691.

Mansouri, A., L. D. Ridgway, A. L. Korapati, Q. Zhang, L. Tian, Y. Wang, Z. H. Siddik, G. B. Mills and F. X. Claret (2003). "Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells." J Biol Chem **278**(21): 19245-19256.

Marechal, A. and L. Zou (2013). "DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(9).

Martin-Rendon, E., S. J. Hale, D. Ryan, D. Baban, S. P. Forde, M. Roubelakis, D. Sweeney, M. Moukayed, A. L. Harris, K. Davies and S. M. Watt (2007). "Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia." Stem Cells **25**(4): 1003-1012.

Martin, L. P., T. C. Hamilton and R. J. Schilder (2008). "Platinum resistance: the role of DNA repair pathways." Clin Cancer Res **14**(5): 1291-1295.

Martin, S. A., C. J. Lord and A. Ashworth (2010). "Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway." Clin Cancer Res **16**(21): 5107-5113.

Mashima, T., M. Naito and T. Tsuruo (1999). "Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis." Oncogene **18**(15): 2423-2430.

Masoud, G. N. and W. Li (2015). "HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy." Acta Pharm Sin B **5**(5): 378-389.

Mattiuzzo, N. R., E. Toulza, N. Jonca, G. Serre and M. Guerrin (2011). "A large-scale multi-technique approach identifies forty-nine new players of keratinocyte terminal differentiation in human epidermis." Exp Dermatol **20**(2): 113-118.

McGrath, E. P., S. E. Logue, K. Mnich, S. Deegan, R. Jager, A. M. Gorman and A. Samali (2018). "The Unfolded Protein Response in Breast Cancer." Cancers (Basel) **10**(10).

McMillin, D. W., J. M. Negri and C. S. Mitsiades (2013). "The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities." Nat Rev Drug Discov **12**(3): 217-228.

Medrek, C., F. Ponten, K. Jirstrom and K. Leandersson (2012). "The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients." BMC Cancer **12**: 306.

Meijer, C., N. H. Mulder, G. A. Hospers, D. R. Uges and E. G. de Vries (1990). "The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line." Br J Cancer **62**(1): 72-77.

Melino, G., V. De Laurenzi and K. H. Vousden (2002). "p73: Friend or foe in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **2**(8): 605-615.

Menko, F. H., E. R. Maher, L. S. Schmidt, L. A. Middelton, K. Aittomaki, I. Tomlinson, S. Richard and W. M. Linehan (2014). "Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC): renal cancer risk, surveillance and treatment." Fam Cancer **13**(4): 637-644.

Messina, S., C. Leonetti, G. De Gregorio, V. Affatigato, G. Ragona, L. Frati, G. Zupi, A. Santoni and A. Porcellini (2004). "Ras inhibition amplifies cisplatin sensitivity of human glioblastoma." Biochem Biophys Res Commun **320**(2): 493-500.

Michaud, W. A., A. C. Nichols, E. A. Mroz, W. C. Faquin, J. R. Clark, S. Begum, W. H. Westra, H. Wada, P. M. Busse, L. W. Ellisen and J. W. Rocco (2009). "Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **15**(5): 1645-1654.

Michiels, C. (2004). "Physiological and pathological responses to hypoxia." Am J Pathol **164**(6): 1875-1882.

Michiels, C., C. Tellier and O. Feron (2016). "Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment." Biochim Biophys Acta **1866**(1): 76-86.

Mikula-Pietrasik, J., A. Witucka, M. Pakula, P. Uruski, B. Begier-Krasinska, A. Niklas, A. Tykarski and K. Ksiazek (2018). "Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells." Cell Mol Life Sci.

Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**(2): 293-299.

Mohseny, A. B. and P. C. Hogendoorn (2011). "Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad." Stem Cells **29**(3): 397-403.

Mole, D. R., P. H. Maxwell, C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe (2001). "Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing." IUBMB Life **52**(1-2): 43-47.

Morizane, Y., R. Honda, K. Fukami and H. Yasuda (2005). "X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO." J Biochem **137**(2): 125-132.

Muscella, A., C. Vetrugno, N. Calabriso, L. G. Cossa, S. A. De Pascali, F. P. Fanizzi and S. Marsigliante (2014). "[Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)] alters SH-SY5Y cell migration and invasion by the inhibition of Na+/H+ exchanger isoform 1 occurring through a PKC-epsilon/ERK/mTOR Pathway." PLoS One **9**(11): e112186.

Muscella, A., C. Vetrugno, D. Migoni, F. Biagioni, F. P. Fanizzi, F. Fornai, S. A. De Pascali and S. Marsigliante (2014). "Antitumor activity of [Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)] in mouse xenograft model of breast cancer." Cell Death Dis **5**: e1014.

Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-365.

Newton, K. and V. M. Dixit (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(3).

Nickerson, M. L., E. Jaeger, Y. Shi, J. A. Durocher, S. Mahurkar, D. Zaridze, V. Matveev, V. Janout, H. Kollarova, V. Bencko, M. Navratilova, N. Szeszenia-Dabrowska, D. Mates, A. Mukeria, I. Holcatova, L. S. Schmidt, J. R. Toro, S. Karami, R. Hung, G. F. Gerard, W. M. Linehan, M. Merino, B. Zbar, P. Boffetta, P. Brennan, N. Rothman, W. H. Chow, F. M. Waldman and L. E. Moore (2008). "Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors." Clin Cancer Res **14**(15): 4726-4734.

Nickerson, M. L., M. B. Warren, J. R. Toro, V. Matrosova, G. Glenn, M. L. Turner, P. Duray, M. Merino, P. Choyke, C. P. Pavlovich, N. Sharma, M. Walther, D. Munroe, R. Hill, E. Maher, C. Greenberg, M. I. Lerman, W. M. Linehan, B. Zbar and L. S. Schmidt (2002). "Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome." Cancer Cell **2**(2): 157-164.

Nijkamp, M. M., P. N. Span, J. Bussink and J. H. Kaanders (2013). "Interaction of EGFR with the tumour microenvironment: implications for radiation treatment." Radiother Oncol **108**(1): 17-23.

Nishitoh, H., A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka and H. Ichijo (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." Genes Dev **16**(11): 1345-1355.

Nishitoh, H., M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano, M. Rothe, K. Miyazono and H. Ichijo (1998). "ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2." Mol Cell **2**(3): 389-395.

Nissou, M. F., M. El Atifi, A. Guttin, C. Godfraind, C. Salon, E. Garcion, B. van der Sanden, J. P. Issartel, F. Berger and D. Wion (2013). "Hypoxia-induced expression of VE-cadherin and filamin B in glioma cell cultures and pseudopalisade structures." J Neurooncol **113**(2): 239-249.

Notte, A., L. Leclere and C. Michiels (2011). "Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer." Biochem Pharmacol **82**(5): 427-434.

Notte, A., M. Rebucci, M. Fransolet, E. Roegiers, M. Genin, C. Tellier, K. Watillon, A. Fattaccioli, T. Arnould and C. Michiels (2015). "Taxol-induced unfolded protein response activation in breast cancer cells exposed to hypoxia: ATF4 activation regulates autophagy and inhibits apoptosis." Int J Biochem Cell Biol **62**: 1-14.

Ohta, T., M. Ohmichi, T. Hayasaka, S. Mabuchi, M. Saitoh, J. Kawagoe, K. Takahashi, H. Igarashi, B. Du, M. Doshida, I. G. Mirei, T. Motoyama, K. Tasaka and H. Kurachi (2006). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in in vivo ovarian cancer models." Endocrinology **147**(4): 1761-1769.

Okada, N., T. Yamamoto, M. Watanabe, Y. Yoshimura, E. Obana, N. Yamazaki, K. Kawazoe, Y. Shinohara and K. Minakuchi (2011). "Identification of TMEM45B as a protein clearly showing thermal aggregation in SDS-PAGE gels and dissection of its amino acid sequence responsible for this aggregation." Protein Expr Purif **77**(1): 118-123.

Olbryt, M., A. Habryka, S. Student, M. Jarzab, T. Tyszkiewicz and K. M. Lisowska (2014). "Global gene expression profiling in three tumor cell lines subjected to experimental cycling and chronic hypoxia." PLoS One **9**(8): e105104.

Ozaki, T. and A. Nakagawara (2005). "p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world." Cancer Sci **96**(11): 729-737.

Pakos-Zebrucka, K., I. Koryga, K. Mnich, M. Ljujic, A. Samali and A. M. Gorman (2016). "The integrated stress response." EMBO Rep **17**(10): 1374-1395.

Palovcak, A., W. Liu, F. Yuan and Y. Zhang (2017). "Maintenance of genome stability by Fanconi anemia proteins." Cell Biosci **7**: 8.

Paredes, F., K. Sheldon, B. Lassegue, H. C. Williams, E. A. Faidley, G. A. Benavides, G. Torres, F. Sanhueza-Olivares, S. M. Yeligar, K. K. Griendling, V. Darley-Usmar and A. San Martin (2018). "Poldip2 is an oxygen-sensitive protein that controls PDH and alphaKGDH lipoylation and activation to support metabolic adaptation in hypoxia and cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(8): 1789-1794.

Paredes, F., I. Suster and A. S. Martin (2018). "Poldip2 takes a central role in metabolic reprograming." Oncoscience **5**(5-6): 130-131.

Parfenov, M., C. S. Pedamallu, N. Gehlenborg, S. S. Freeman, L. Danilova, C. A. Bristow, S. Lee, A. G. Hadjipanayis, E. V. Ivanova, M. D. Wilkerson, A. Protopopov, L. Yang, S. Seth, X. Song, J. Tang, X. Ren, J. Zhang, A. Pantazi, N. Santoso, A. W. Xu, H. Mahadeshwar, D. A. Wheeler, R. I. Haddad, J. Jung, A. I. Ojesina, N. Issaeva, W. G. Yarbrough, D. N. Hayes, J. R. Grandis, A. K. El-Naggar, M. Meyerson, P. J. Park, L. Chin, J. G. Seidman, P. S. Hammerman, R. Kucherlapati and N. Cancer Genome Atlas (2014). "Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(43): 15544-15549.

Park, J., D. T. Long, K. Y. Lee, T. Abbas, E. Shibata, M. Negishi, Y. Luo, J. C. Schimenti, A. Gambus, J. C. Walter and A. Dutta (2013). "The MCM8-MCM9 complex promotes RAD51 recruitment at DNA damage sites to facilitate homologous recombination." Mol Cell Biol **33**(8): 1632-1644.

Parrish, A. B., C. D. Freel and S. Kornbluth (2013). "Cellular mechanisms controlling caspase activation and function." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(6).

Pastorekova, S., M. Zatovicova and J. Pastorek (2008). "Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition." Curr Pharm Des **14**(7): 685-698.

Pavlovich, C. P., M. M. Walther, R. A. Eyler, S. M. Hewitt, B. Zbar, W. M. Linehan and M. J. Merino (2002). "Renal tumors in the Birt-Hogg-Dube syndrome." Am J Surg Pathol **26**(12): 1542-1552.

Peinado, H., D. Olmeda and A. Cano (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" Nat Rev Cancer **7**(6): 415-428.

Peiris-Pages, M., F. Sotgia and M. P. Lisanti (2015). "Chemotherapy induces the cancer-associated fibroblast phenotype, activating paracrine Hedgehog-GLI signalling in breast cancer cells." Oncotarget **6**(13): 10728-10745.

Persons, D. L., E. M. Yazlovitskaya and J. C. Pelling (2000). "Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin." J Biol Chem **275**(46): 35778-35785.

Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." J Biol Chem **284**(33): 21777-21781.

Porporato, P. E., V. L. Payen, C. J. De Saedeleer, V. Preat, J. P. Thissen, O. Feron and P. Sonveaux (2012). "Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice." Angiogenesis **15**(4): 581-592.

Posadas, E. M., S. Limvorasak and R. A. Figlin (2017). "Targeted therapies for renal cell carcinoma." Nat Rev Nephrol **13**(8): 496-511.

Posadas, E. M., S. Limvorasak, S. Sharma and R. A. Figlin (2013). "Targeting angiogenesis in renal cell carcinoma." Expert Opin Pharmacother **14**(16): 2221-2236.

Pouliot, L. M., D. W. Shen, T. Suzuki, M. D. Hall and M. M. Gottesman (2013). "Contributions of microRNA dysregulation to cisplatin resistance in adenocarcinoma cells." Exp Cell Res **319**(4): 566-574.

Prabhakar, N. R. and G. L. Semenza (2012). "Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2." Physiol Rev **92**(3): 967-1003.

Puthalakath, H. and A. Strasser (2002). "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins." Cell Death Differ **9**(5): 505-512.

Pytynia, K. B., K. R. Dahlstrom and E. M. Sturgis (2014). "Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer." Oral Oncol **50**(5): 380-386.

Qi, X., B. Jia, X. Zhao and D. Yu (2017). "Advances in T-cell checkpoint immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma." Onco Targets Ther **10**: 5745-5754.

Quail, D. F. and J. A. Joyce (2013). "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis." Nat Med **19**(11): 1423-1437.

Radreau, P., J. D. Rhodes, R. F. Mithen, P. A. Kroon and J. Sanderson (2009). "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) pathway activation by quercetin in human lens epithelial cells." Exp Eye Res **89**(6): 995-1002.

Raina, D., P. Pandey, R. Ahmad, A. Bharti, J. Ren, S. Kharbanda, R. Weichselbaum and D. Kufe (2005). "c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage." J Biol Chem **280**(12): 11147-11151.

Rajandram, R., N. C. Bennett, C. Morais, D. W. Johnson and G. C. Gobe (2012). "Renal cell carcinoma: resistance to therapy, role of apoptosis, and the prognostic and therapeutic target potential of TRAF proteins." Med Hypotheses **78**(2): 330-336.

Ramadan, S., A. Terrinoni, M. V. Catani, A. E. Sayan, R. A. Knight, M. Mueller, P. H. Krammer, G. Melino and E. Candi (2005). "p73 induces apoptosis by different mechanisms." Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 713-717.

Ramer, R., T. Schmied, C. Wagner, M. Haustein and B. Hinz (2018). "The antiangiogenic action of cisplatin on endothelial cells is mediated through the release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells." Oncotarget **9**(75): 34038-34055.

Rankin, E. B. and A. J. Giaccia (2008). "The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis." Cell Death Differ **15**(4): 678-685.

Rass, E., A. Grabarz, P. Bertrand and B. S. Lopez (2012). "[Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]." Cancer Radiother **16**(1): 1-10.

Raza, A., M. J. Franklin and A. Z. Dudek (2010). "Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis." Am J Hematol **85**(8): 593-598.

Rebucci, M. and C. Michiels (2013). "Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy." Biochem Pharmacol **85**(9): 1219-1226.

Reed, J. C. (1998). "Bcl-2 family proteins." Oncogene **17**(25): 3225-3236.

Ren, D., L. A. Fisher, J. Zhao, L. Wang, B. C. Williams, M. L. Goldberg and A. Peng (2017). "Cell cycle-dependent regulation of Greatwall kinase by protein phosphatase 1 and regulatory subunit 3B." J Biol Chem **292**(24): 10026-10034.

Rini, B. I. and M. B. Atkins (2009). "Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma." Lancet Oncol **10**(10): 992-1000.

Robertson, N., C. Potter and A. L. Harris (2004). "Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion." Cancer Res **64**(17): 6160-6165.

Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., and Gottesman, M. M. (2018) Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. Nat Rev Cancer 18, 452-464

Rocha, C. R., C. C. Garcia, D. B. Vieira, A. Quinet, L. C. de Andrade-Lima, V. Munford, J. E. Belizario and C. F. Menck (2014). "Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo." Cell Death Dis **5**: e1505.

Rocha, C. R. R., M. M. Silva, A. Quinet, J. B. Cabral-Neto and C. F. M. Menck (2018). "DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship." Clinics (Sao Paulo) **73**(suppl 1): e478s.

Rock, K. L. and H. Kono (2008). "The inflammatory response to cell death." Annu Rev Pathol **3**: 99-126.

Rogakou, E. P., W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier and W. M. Bonner (2000). "Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139." J Biol Chem **275**(13): 9390-9395.

Rosenberg, B., L. Vancamp and T. Krigas (1965). "Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode." Nature **205**: 698-699.

Rouleau, M., A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann and G. G. Poirier (2010). "PARP inhibition: PARP1 and beyond." Nat Rev Cancer **10**(4): 293-301.

Rubin Grandis, J., M. F. Melhem, E. L. Barnes and D. J. Tweardy (1996). "Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." Cancer **78**(6): 1284-1292.

Rutkowski, D. T. and R. S. Hegde (2010). "Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response." J Cell Biol **189**(5): 783-794.

Safaei, R., A. K. Holzer, K. Katano, G. Samimi and S. B. Howell (2004). "The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs." J Inorg Biochem **98**(10): 1607-1613.

Sakai, W., E. M. Swisher, C. Jacquemont, K. V. Chandramohan, F. J. Couch, S. P. Langdon, K. Wurz, J. Higgins, E. Villegas and T. Taniguchi (2009). "Functional restoration of BRCA2 protein by secondary BRCA2 mutations in BRCA2-mutated ovarian carcinoma." Cancer Res **69**(16): 6381-6386.

Sakai, W., E. M. Swisher, B. Y. Karlan, M. K. Agarwal, J. Higgins, C. Friedman, E. Villegas, C. Jacquemont, D. J. Farrugia, F. J. Couch, N. Urban and T. Taniguchi (2008). "Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers." Nature **451**(7182): 1116-1120.

Salceda, S. and J. Caro (1997). "Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes." J Biol Chem **272**(36): 22642-22647.

Schiefler, C., G. Piontek, J. Doescher, D. Schuettler, M. Misslbeck, M. Rudelius, A. Haug, R. Reiter, G. Brockhoff and A. Pickhard (2014). "Inhibition of SphK1 reduces radiation-induced migration and enhances sensitivity to cetuximab treatment by affecting the EGFR / SphK1 crosstalk." Oncotarget **5**(20): 9877-9888.

Schmidt, L., F. M. Duh, F. Chen, T. Kishida, G. Glenn, P. Choyke, S. W. Scherer, Z. Zhuang, I. Lubensky, M. Dean, R. Allikmets, A. Chidambaram, U. R. Bergerheim, J. T. Feltis, C. Casadevall, A. Zamarron, M. Bernues, S. Richard, C. J. Lips, M. M. Walther, L. C. Tsui, L. Geil, M. L. Orcutt, T. Stackhouse, J. Lipan, L. Slife, H. Brauch, J. Decker, G. Niehans, M. D. Hughson, H. Moch, S. Storkel, M. I. Lerman, W. M. Linehan and B. Zbar (1997). "Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas." Nat Genet **16**(1): 68-73.

Schmidt, L. S., M. B. Warren, M. L. Nickerson, G. Weirich, V. Matrosova, J. R. Toro, M. L. Turner, P. Duray, M. Merino, S. Hewitt, C. P. Pavlovich, G. Glenn, C. R. Greenberg, W. M. Linehan and B. Zbar (2001). "Birt-Hogg-Dube syndrome, a genodermatosis associated with spontaneous pneumothorax and kidney neoplasia, maps to chromosome 17p11.2." Am J Hum Genet **69**(4): 876-882.

Schmit, K. and C. Michiels (2018). "TMEM proteins in cancer." Frontiers in Pharmacology: in press.

Schodel, J., S. Grampp, E. R. Maher, H. Moch, P. J. Ratcliffe, P. Russo and D. R. Mole (2016). "Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer." Eur Urol **69**(4): 646-657.

Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 343-354.

Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." Annu Rev Biochem **74**: 739-789.

Scott, F. L., B. Stec, C. Pop, M. K. Dobaczewska, J. J. Lee, E. Monosov, H. Robinson, G. S. Salvesen, R. Schwarzenbacher and S. J. Riedl (2009). "The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering." Nature **457**(7232): 1019-1022.

Scriven, P., S. Coulson, R. Haines, S. Balasubramanian, S. Cross and L. Wyld (2009). "Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer." Br J Cancer **101**(10): 1692-1698.

Seiwert, T. Y., J. Fayette, D. Cupissol, J. M. Del Campo, P. M. Clement, R. Hitt, M. Degardin, W. Zhang, A. Blackman, E. Ehrnrooth and E. E. Cohen (2014). "A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck." Ann Oncol **25**(9): 1813-1820.

Seiwert, T. Y., Z. Zuo, M. K. Keck, A. Khattri, C. S. Pedamallu, T. Stricker, C. Brown, T. J. Pugh, P. Stojanov, J. Cho, M. S. Lawrence, G. Getz, J. Bragelmann, R. DeBoer, R. R. Weichselbaum, A. Langerman, L. Portugal, E. Blair, K. Stenson, M. W. Lingen, E. E. Cohen, E. E. Vokes, K. P. White and P. S. Hammerman (2015). "Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas." Clin Cancer Res **21**(3): 632-641.

Selvakumar, T., A. Gjidoda, S. L. Hovde and R. W. Henry (2012). "Regulation of human RNA polymerase III transcription by DNMT1 and DNMT3a DNA methyltransferases." J Biol Chem **287**(10): 7039-7050.

Selvakumaran, M., D. A. Pisarcik, R. Bao, A. T. Yeung and T. C. Hamilton (2003). "Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines." Cancer Res **63**(6): 1311-1316.

Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-732.

Semenza, G. L. (2010). "Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics." Oncogene **29**(5): 625-634.

Semenza, G. L. (2012). "Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy." Trends Pharmacol Sci **33**(4): 207-214.

Semenza, G. L. and G. L. Wang (1992). "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation." Mol Cell Biol **12**(12): 5447-5454.

Sermeus, A., J. P. Cosse, M. Crespin, V. Mainfroid, F. de Longueville, N. Ninane, M. Raes, J. Remacle and C. Michiels (2008). "Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity." Mol Cancer **7**: 27.

Shah, Y. M. and L. Xie (2014). "Hypoxia-inducible factors link iron homeostasis and erythropoiesis." Gastroenterology **146**(3): 630-642.

Shamas-Din, A., H. Brahmbhatt, B. Leber and D. W. Andrews (2011). "BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis." Biochim Biophys Acta **1813**(4): 508-520.

Shamas-Din, A., J. Kale, B. Leber and D. W. Andrews (2013). "Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(4): a008714.

Shan, Y. X., T. J. Liu, H. F. Su, A. Samsamshariat, R. Mestril and P. H. Wang (2003). "Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells." J Mol Cell Cardiol **35**(9): 1135-1143.

Sharma, A., K. Singh and A. Almasan (2012). "Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage." Methods Mol Biol **920**: 613-626.

Shayan, G., R. Srivastava, J. Li, N. Schmitt, L. P. Kane and R. L. Ferris (2017). "Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer." Oncoimmunology **6**(1): e1261779.

Shen, D., I. Pastan and M. M. Gottesman (1998). "Cross-resistance to methotrexate and metals in human cisplatin-resistant cell lines results from a pleiotropic defect in accumulation of these compounds associated with reduced plasma membrane binding proteins." Cancer Res **58**(2): 268-275.

Shen, D. W. and M. M. Gottesman (2012). "RAB8 enhances TMEM205-mediated cisplatin resistance." Pharm Res **29**(3): 643-650.

Shen, D. W., X. J. Liang, M. A. Gawinowicz and M. M. Gottesman (2004). "Identification of cytoskeletal [14C]carboplatin-binding proteins reveals reduced expression and disorganization of actin and filamin in cisplatin-resistant cell lines." Mol Pharmacol **66**(4): 789-793.

Shen, D. W., X. J. Liang, T. Suzuki and M. M. Gottesman (2006). "Identification by functional cloning from a retroviral cDNA library of cDNAs for ribosomal protein L36 and the 10-kDa heat shock protein that confer cisplatin resistance." Mol Pharmacol **69**(4): 1383-1388.

Shen, D. W., J. Ma, M. Okabe, G. Zhang, D. Xia and M. M. Gottesman (2010). "Elevated expression of TMEM205, a hypothetical membrane protein, is associated with cisplatin resistance." J Cell Physiol **225**(3): 822-828.

Shen, D. W., L. M. Pouliot, J. P. Gillet, W. Ma, A. C. Johnson, M. D. Hall and M. M. Gottesman (2012). "The transcription factor GCF2 is an upstream repressor of the small GTPAse RhoA, regulating membrane protein trafficking, sensitivity to doxorubicin, and resistance to cisplatin." Mol Pharm **9**(6): 1822-1833.

Shen, D. W., L. M. Pouliot, M. D. Hall and M. M. Gottesman (2012). "Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes." Pharmacol Rev **64**(3): 706-721.

Shen, D. W., A. Su, X. J. Liang, A. Pai-Panandiker and M. M. Gottesman (2004). "Reduced expression of small GTPases and hypermethylation of the folate binding protein gene in cisplatin-resistant cells." Br J Cancer **91**(2): 270-276.

Sheng, X., Y. J. Arnoldussen, M. Storm, M. Tesikova, H. Z. Nenseth, S. Zhao, L. Fazli, P. Rennie, B. Risberg, H. Waehre, H. Danielsen, I. G. Mills, Y. Jin, G. Hotamisligil and F. Saatcioglu (2015). "Divergent androgen regulation of unfolded protein response pathways drives prostate cancer." EMBO Mol Med **7**(6): 788-801.

Shi, S., P. Tan, B. Yan, R. Gao, J. Zhao, J. Wang, J. Guo, N. Li and Z. Ma (2016). "ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells." Oncol Rep **35**(5): 2606-2614.

Siddik, Z. H. (2003). "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." Oncogene **22**(47): 7265-7279.

Siddiqui, M. A., S. Mukherjee, P. Manivannan and K. Malathi (2015). "RNase L Cleavage Products Promote Switch from Autophagy to Apoptosis by Caspase-Mediated Cleavage of Beclin-1." Int J Mol Sci **16**(8): 17611-17636.

Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2012). "Cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **62**(1): 10-29.

Simonyan, L., T. T. Renault, M. J. Novais, M. J. Sousa, M. Corte-Real, N. Camougrand, C. Gonzalez and S. Manon (2016). "Regulation of Bax/mitochondria interaction by AKT." FEBS Lett **590**(1): 13-21.

Sinha, R., A. G. Winer, M. Chevinsky, C. Jakubowski, Y. B. Chen, Y. Dong, S. K. Tickoo, V. E. Reuter, P. Russo, J. A. Coleman, C. Sander, J. J. Hsieh and A. A. Hakimi (2017). "Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection." Nat Commun **8**: 15165.

Slee, E. A., M. T. Harte, R. M. Kluck, B. B. Wolf, C. A. Casiano, D. D. Newmeyer, H. G. Wang, J. C. Reed, D. W. Nicholson, E. S. Alnemri, D. R. Green and S. J. Martin (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." J Cell Biol **144**(2): 281-292.

Smeets, M. F., E. H. Mooren, A. H. Abdel-Wahab, H. Bartelink and A. C. Begg (1994). "Differential repair of radiation-induced DNA damage in cells of human squamous cell carcinoma and the effect of caffeine and cysteamine on induction and repair of DNA double-strand breaks." Radiat Res **140**(2): 153-160.

Smith, L., K. J. Welham, M. B. Watson, P. J. Drew, M. J. Lind and L. Cawkwell (2007). "The proteomic analysis of cisplatin resistance in breast cancer cells." Oncol Res **16**(11): 497-506.

Soldatenkov, V. A., A. Albor, B. K. Patel, R. Dreszer, A. Dritschilo and V. Notario (1999). "Regulation of the human poly(ADP-ribose) polymerase promoter by the ETS transcription factor." Oncogene **18**(27): 3954-3962.

Spence, T., J. Bruce, K. W. Yip and F. F. Liu (2016). "HPV Associated Head and Neck Cancer." Cancers (Basel) **8**(8).

Srinivasula, S. M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." Mol Cell **1**(7): 949-957.

Staff, P. O. (2015). "Correction: [Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)] alters SH-SY5Y cell migration and invasion by the inhibition of Na+/H+ exchanger isoform 1 occurring through a PKC-epsilon/ERK/mTOR pathway." PLoS One **10**(3): e0118490.

Stennicke, H. R., J. M. Jurgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B. B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H. M. Ellerby, L. M. Ellerby, D. Bredesen, D. R. Green, J. C. Reed, C. J. Froelich and G. S. Salvesen (1998). "Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8." J Biol Chem **273**(42): 27084-27090.

Suarez-Lopez, L., G. Sriram, Y. W. Kong, S. Morandell, K. A. Merrick, Y. Hernandez, K. M. Haigis and M. B. Yaffe (2018). "MK2 contributes to tumor progression by promoting M2 macrophage polarization and tumor angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(18): E4236-E4244.

Sun, P., Y. Song, D. Liu, G. Liu, X. Mao, B. Dong, E. I. Braicu and J. Sehouli (2018). "Potential role of the HOXD8 transcription factor in cisplatin resistance and tumour metastasis in advanced epithelial ovarian cancer." Sci Rep **8**(1): 13483.

Sun, W., G. Qiu, Y. Zou, Z. Cai, P. Wang, X. Lin, J. Huang, L. Jiang, X. Ding and G. Hu (2015). "Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells." Int J Clin Exp Pathol **8**(10): 12657-12667.

Suzuki, K. (2002). "MAP kinase cascades in elicitor signal transduction." J Plant Res **115**(3): 237-244.

Suzuki, Y., Y. Nakabayashi and R. Takahashi (2001). "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8662-8667.

Swisher, E. M., W. Sakai, B. Y. Karlan, K. Wurz, N. Urban and T. Taniguchi (2008). "Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance." Cancer Res **68**(8): 2581-2586.

Syrjanen, K. J., S. Pyrhonen, S. M. Syrjanen and M. A. Lamberg (1983). "Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions." Br J Oral Surg **21**(2): 147-153.

Szegezdi, E., U. Fitzgerald and A. Samali (2003). "Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far." Ann N Y Acad Sci **1010**: 186-194.

Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman and A. Samali (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-885.

Tabas, I. and D. Ron (2011). "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." Nat Cell Biol **13**(3): 184-190.

Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-632.

Tang, C., H. Luo, D. Luo, H. Yang and X. Zhou (2018). "Src homology phosphotyrosyl phosphatase 2 mediates cisplatin-related drug resistance by inhibiting apoptosis and activating the Ras/PI3K/Akt1/survivin pathway in lung cancer cells." Oncol Rep **39**(2): 611-618.

Tang, D. and V. J. Kidd (1998). "Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis." J Biol Chem **273**(44): 28549-28552.

Thibodeau, B. J., M. Fulton, L. E. Fortier, T. J. Geddes, B. L. Pruetz, S. Ahmed, A. Banes-Berceli, P. L. Zhang, G. D. Wilson and J. Hafron (2016). "Characterization of clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling." Urol Oncol **34**(4): 168 e161-169.

Thomas, G. V., C. Tran, I. K. Mellinghoff, D. S. Welsbie, E. Chan, B. Fueger, J. Czernin and C. L. Sawyers (2006). "Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer." Nat Med **12**(1): 122-127.

Thorburn, A. (2004). "Death receptor-induced cell killing." Cell Signal **16**(2): 139-144.

Torrecilla, J., A. Rodriguez-Gascon, M. A. Solinis and A. del Pozo-Rodriguez (2014). "Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives." Biomed Res Int **2014**: 161794.

Tredan, O., C. M. Galmarini, K. Patel and I. F. Tannock (2007). "Drug resistance and the solid tumor microenvironment." J Natl Cancer Inst **99**(19): 1441-1454.

Urquidi, V., S. Goodison, Y. Cai, Y. Sun and C. J. Rosser (2012). "A candidate molecular biomarker panel for the detection of bladder cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **21**(12): 2149-2158.

Vargas-Roig, L. M., F. E. Gago, O. Tello, J. C. Aznar and D. R. Ciocca (1998). "Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy." Int J Cancer **79**(5): 468-475.

Vaupel, P. and A. Mayer (2007). "Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 225-239.

Vayssade, M., H. Haddada, L. Faridoni-Laurens, S. Tourpin, A. Valent, J. Benard and J. C. Ahomadegbe (2005). "P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells." Int J Cancer **116**(6): 860-869.

Vazquez, S., L. Leon, O. Fernandez, M. Lazaro, E. Grande and L. Aparicio (2012). "Sunitinib: the first to arrive at first-line metastatic renal cell carcinoma." Adv Ther **29**(3): 202-217.

Vermorken, J. B., R. Mesia, F. Rivera, E. Remenar, A. Kawecki, S. Rottey, J. Erfan, D. Zabolotnyy, H. R. Kienzer, D. Cupissol, F. Peyrade, M. Benasso, I. Vynnychenko, D. De Raucourt, C. Bokemeyer, A. Schueler, N. Amellal and R. Hitt (2008). "Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer." N Engl J Med **359**(11): 1116-1127.

Vermorken, J. B. and P. Specenier (2010). "Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer." Ann Oncol **21 Suppl 7**: vii252-261.

Vetrugno, C., A. Muscella, F. P. Fanizzi, L. G. Cossa, D. Migoni, S. A. De Pascali and S. Marsigliante (2014). "Different apoptotic effects of [Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)] and cisplatin on normal and cancerous human epithelial breast cells in primary culture." Br J Pharmacol **171**(22): 5139-5153.

Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.

Vlahovic, G. and J. Crawford (2003). "Activation of tyrosine kinases in cancer." Oncologist **8**(6): 531-538.

Vyas, D., G. Laput and A. K. Vyas (2014). "Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis." Onco Targets Ther **7**: 1015-1023.

Wang, F., M. Liu, X. Li and H. Tang (2013). "MiR-214 reduces cell survival and enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of Bcl2l2 in cervical cancer cells." FEBS Lett **587**(5): 488-495.

Wang, M. and R. J. Kaufman (2014). "The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development." Nat Rev Cancer **14**(9): 581-597.

Wang, X., J. L. Martindale and N. J. Holbrook (2000). "Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis." J Biol Chem **275**(50): 39435-39443.

Webb, S. J., D. J. Harrison and A. H. Wyllie (1997). "Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease." Adv Pharmacol **41**: 1-34.

Williams, J., P. C. Lucas, K. A. Griffith, M. Choi, S. Fogoros, Y. Y. Hu and J. R. Liu (2005). "Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease." Gynecol Oncol **96**(2): 287-295.

Wilson, L. A., H. Yamamoto and G. Singh (2004). "Role of the transcription factor Ets-1 in cisplatin resistance." Mol Cancer Ther **3**(7): 823-832.

Worsham, M. J. (2011). "Identifying the risk factors for late-stage head and neck cancer." Expert Rev Anticancer Ther **11**(9): 1321-1325.

Wouters, B. G. and M. Koritzinsky (2008). "Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer." Nat Rev Cancer **8**(11): 851-864.

Wouters, B. G., T. van den Beucken, M. G. Magagnin, M. Koritzinsky, D. Fels and C. Koumenis (2005). "Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation." Semin Cell Dev Biol **16**(4-5): 487-501.

Wrzesinski, T., M. Szelag, W. A. Cieslikowski, A. Ida, R. Giles, E. Zodro, J. Szumska, J. Pozniak, Z. Kwias, H. A. Bluyssen and J. Wesoly (2015). "Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors." BMC Cancer **15**: 518.

Xu, C., C. D. Fan and X. Wang (2015). "Regulation of Mdm2 protein stability and the p53 response by NEDD4-1 E3 ligase." Oncogene **34**(3): 281-289.

Xu, Y., C. Wang and Z. Li (2014). "A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress." Mol Clin Oncol **2**(1): 3-7.

Xu, Y., H. Yu, H. Qin, J. Kang, C. Yu, J. Zhong, J. Su, H. Li and L. Sun (2012). "Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells." Cancer Lett **314**(2): 232-243.

Xue, Y., L. Yang, J. Li, Y. Yan, Q. Jiang, L. Shen, S. Yang, B. Shen, R. Huang, J. Yan and H. Guo (2018). "Combination chemotherapy with Zyflamend reduced the acquired resistance of bladder cancer cells to cisplatin through inhibiting NFkappaB signaling pathway." Onco Targets Ther **11**: 4413-4429.

Yamazaki, H., H. Tateyama, K. Asai, I. Fukai, Y. Fujii, T. Tada and T. Eimoto (2005). "Glia maturation factor-beta is produced by thymoma and may promote intratumoral T-cell differentiation." Histopathology **47**(3): 292-302.

Yan, M., J. Ni, D. Song, M. Ding and J. Huang (2015). "Activation of unfolded protein response protects osteosarcoma cells from cisplatin-induced apoptosis through NF-kappaB pathway." Int J Clin Exp Pathol **8**(9): 10204-10215.

Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.

Yeh, P. Y., S. E. Chuang, K. H. Yeh, Y. C. Song, C. K. Ea and A. L. Cheng (2002). "Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation." Biochem Pharmacol **63**(8): 1423-1430.

Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**(7): 881-891.

Yoshida, M., A. R. Khokhar and Z. H. Siddik (1994). "Biochemical pharmacology of homologous alicyclic mixed amine platinum(II) complexes in sensitive and resistant tumor cell lines." Cancer Res **54**(13): 3468-3473.

Youn, C. K., M. H. Kim, H. J. Cho, H. B. Kim, I. Y. Chang, M. H. Chung and H. J. You (2004). "Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents." Cancer Res **64**(14): 4849-4857.

Yu, F., J. Megyesi, R. L. Safirstein and P. M. Price (2007). "Involvement of the CDK2-E2F1 pathway in cisplatin cytotoxicity in vitro and in vivo." Am J Physiol Renal Physiol **293**(1): F52-59.

Yu, H., J. Su, Y. Xu, J. Kang, H. Li, L. Zhang, H. Yi, X. Xiang, F. Liu and L. Sun (2011). "p62/SQSTM1 involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by clearing ubiquitinated proteins." Eur J Cancer **47**(10): 1585-1594.

Yuan, M., P. Luong, C. Hudson, K. Gudmundsdottir and S. Basu (2010). "c-Abl phosphorylation of DeltaNp63alpha is critical for cell viability." Cell Death Dis **1**: e16.

Yuen, G. J., E. Demissie and S. Pillai (2016). "B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship." Trends Cancer **2**(12): 747-757.

Zaman, G. J., J. Lankelma, O. van Tellingen, J. Beijnen, H. Dekker, C. Paulusma, R. P. Oude Elferink, F. Baas and P. Borst (1995). "Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7690-7694.

Zbar, B., H. Brauch, C. Talmadge and M. Linehan (1987). "Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma." Nature **327**(6124): 721-724.

Zelcer, N., T. Saeki, G. Reid, J. H. Beijnen and P. Borst (2001). "Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3)." J Biol Chem **276**(49): 46400-46407.

Zhang, D. and T. C. Putti (2010). "Over-expression of ERp29 attenuates doxorubicin-induced cell apoptosis through up-regulation of Hsp27 in breast cancer cells." Exp Cell Res **316**(20): 3522-3531.

Zhang, J., X. H. Yu, Y. G. Yan, C. Wang and W. J. Wang (2015). "PI3K/Akt signaling in osteosarcoma." Clin Chim Acta **444**: 182-192.

Zhang, K. and R. J. Kaufman (2006). "The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease." Neurology **66**(2 Suppl 1): S102-109.

Zhang, Y., L. H. Rohde and H. Wu (2009). "Involvement of nucleotide excision and mismatch repair mechanisms in double strand break repair." Curr Genomics **10**(4): 250-258.

Zhao, H. and H. Piwnica-Worms (2001). "ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1." Mol Cell Biol **21**(13): 4129-4139.

Zhao, R. and W. A. Houry (2005). "Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation." Biochem Cell Biol **83**(6): 703-710.

Zhong, H., A. M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D. A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W. B. Isaacs, G. L. Semenza and J. W. Simons (1999). "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases." Cancer Res **59**(22): 5830-5835.

Zhu, H., X. P. Chen, S. F. Luo, J. Guan, W. G. Zhang and B. X. Zhang (2005). "Involvement of hypoxia-inducible factor-1-alpha in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells." J Exp Clin Cancer Res **24**(4): 565-574.

Zhu, H., H. Luo, W. Zhang, Z. Shen, X. Hu and X. Zhu (2016). "Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer." Drug Des Devel Ther **10**: 1885-1895.

Zhuo, W., Y. Wang, X. Zhuo, Y. Zhang, X. Ao and Z. Chen (2008). "Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway." Lung Cancer **62**(1): 8-14.

Zimmermann, M., A. Zouhair, D. Azria and M. Ozsahin (2006). "The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications." Radiat Oncol **1**: 11.

Zinszner, H., M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R. T. Lightfoot, H. Remotti, J. L. Stevens and D. Ron (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum." Genes Dev **12**(7): 982-995.

Zou, H., Y. Li, X. Liu and X. Wang (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." J Biol Chem **274**(17): 11549-11556.