



HAL
open science

Mecanisme de regulation de l'activite du microARN miR-16 dans le melanome uveal

Anaïs Quéméner

► **To cite this version:**

Anaïs Quéméner. Mecanisme de regulation de l'activite du microARN miR-16 dans le melanome uveal. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1B025 . tel-04253630

HAL Id: tel-04253630

<https://theses.hal.science/tel-04253630>

Submitted on 23 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Par **Anaïs QUÉMÉNER**

Mécanisme de régulation de l'activité du microARN miR-16 dans le mélanome uvéal

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 22 octobre 2020
Unité de recherche : UMR6290 CNRS-UR1 Institut de Génétique et Développement de Rennes
Équipe Expression des Gènes et Oncogénèse

Rapporteurs avant soutenance :

Stéphan VAGNER DR, Institut Curie, CNRS URM3348
Roger REZZONICO CR IPMC- CNRS 7275

Composition du Jury :

Frédéric MOURIAUX PU-PH INSERM U1242
Président
Stéphan VAGNER DR, Institut Curie, CNRS URM3348
Rapporteur
Roger REZZONICO CR IPMC- CNRS 7275
Rapporteur
Corine BERTOLOTTO DR, C3M INSERM U1065
Examinatrice
Marina BOUSQUET CR UMR1037 INSERM ERL5294 CNRS
Examinatrice
Marie-Dominique GALIBERT PU-PH, IGDR UMR6290 UR1-
CNRS
Examinatrice
David GILOT MCU IGDR UMR6290 UR1-CNRS
Directeur de thèse

À ma Mamie,
À mon Papy,

Remerciements

Seul mon nom apparait en tant qu'auteur sur la première page de ce manuscrit. Ce n'est pas pour autant qu'il est le fruit de mon seul travail, loin de là. J'espère n'oublier personne dans la longue liste de tous ceux sans qui mon « aventure » de thèse n'aurait pas été la même, ou n'aurait tout simplement pas eu lieu.

Je voudrais tout d'abord remercier chaleureusement la Ligue nationale contre le cancer d'avoir financé ces trois années de thèse. Je suis donc extrêmement reconnaissante envers les donateurs : patients, familles et tous ceux qui soutiennent la recherche. J'espère avoir fait honneur à vos dons par ce travail. Je souhaite également remercier le ministère français de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation d'avoir financé une prolongation de contrat, afin de compenser les difficultés relatives à la crise sanitaire. Je remercie enfin Rennes Métropole, pour l'attribution de la bourse de mobilité qui m'a permis de rejoindre le laboratoire du Pr. Pandolfi à Boston, à l'occasion d'une mobilité doctorale.

Je tiens à adresser tous mes remerciements à Roger Rezzonico, ainsi qu'à Stéphan Vagner, pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Merci de vos précieux conseils pour l'amélioration de ce manuscrit. Je remercie également Marina Bousquet, Corine Bertolotto et Frédéric Mouriaux d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

J'adresse aussi ma profonde reconnaissance à ceux sans qui ce travail n'aurait vu le jour : mes collègues. La thèse m'aura vraiment appris ce que le travail d'équipe signifie.

David, que te dire de plus qu'un immense **MERCI**. Merci de m'avoir fait confiance depuis le M2, d'avoir cru en moi pour l'obtention de cette bourse de thèse et, par la suite, de m'avoir encadrée et accompagnée durant ces trois ans. Merci de m'avoir encouragée lorsque je voulais partir en mobilité, d'avoir appuyé ma demande auprès des labos qui me tentaient ; ce qui m'a permis de passer ces trois mois très formateurs

à Boston. Tu m'as aussi confié tes élèves et laissé carte blanche lorsque je voulais tester mes aptitudes à l'enseignement, tu m'as confié l'encadrement de stagiaires. Mais surtout, tu m'as laissée orienter mon projet avec une grande liberté, prenant en considération chacune de mes idées et m'apportant les tiennes pour enrichir ce projet. Cette liberté m'a fait gagner en autonomie pour, petit à petit, prendre les choses en main. Pour tout cela, je te suis infiniment reconnaissante. Durant ces trois ans, tu as été obligé de te battre continuellement contre mon manque d'optimisme et mon manque de confiance en moi, mais je n'oublierai pas de continuer à travailler dessus ☺. Je te souhaite le meilleur pour tous tes futurs projets.

Marie-Do, merci de m'avoir accueillie dans votre équipe aussi chaleureusement. Vous avez été mon enseignante lorsqu'en PACES, tout juste sortie du BAC, j'assistais à mon premier cours en amphithéâtre. Aujourd'hui, je clôture mes années étudiantes à vos côtés. Je vous remercie de votre gentillesse, de nos échanges au labo le soir, entre nos deux bureaux, ou téléphoniques pendant le confinement (vous avez assuré la lutte contre l'isolement et le confinement des thésards). Merci également de m'avoir fait confiance en appuyant mes démarches depuis l'obtention de ma bourse de thèse jusqu'à mes récentes lettres de motivation pour les recherches de post-doc. Je vous souhaite également le meilleur pour les futurs projets de l'équipe. Je suis fière d'en avoir fait partie, et je serai assurément nostalgique de la quitter ; mais surtout, je resterai reconnaissante de tout ce qu'elle m'a apporté.

David et Marie-Do, vous avez été comme des « parents » professionnels pour moi. Interlocuteurs privilégiés, vous m'avez aidée à grandir et mûrir. Je n'imaginai pas que ma thèse se déroulerait ainsi ; merci pour votre implication jusqu'au bout, malgré les obstacles.

Laura, mon binôme de choc, mon mentor technique et surtout, grâce à tout cela, une amie chère ; je te remercie sincèrement. Heureusement que tu n'as pas compté toutes les fois où je suis venue te voir pour te dire : « J'ai une petite question (bête ? ;-)) ». C'était un plaisir de travailler avec toi, nous formions une chouette équipe. Merci pour ton soutien quand le moral, contrairement au travail, n'y était plus. Merci aussi d'avoir partagé mon enthousiasme lors de nos plus gros succès expérimentaux et, surtout, merci d'avoir toujours encouragé mes petits coups de sonde, juste pour voir (même quand ça ajoutait une ligne à ta « to do list », ou 15 gènes sur

ta qPCR ~). Un immense merci d'avoir corrigé mes innombrables fautes d'orthographe. Merci également pour tous les moments en dehors du labo. Bientôt nous ne serons plus collègues ; pour autant, je serai toujours heureuse de partager du temps avec toi, que ce soit autour d'une « smoothyclette » ou pour toute autre occasion de se retrouver.

À tous mes collègues thésards, je dois beaucoup. C'est inestimable de pouvoir partager au quotidien les petits tracas de la thèse et j'ai de la chance de pouvoir tous vous compter parmi mes amis. Travailler chaque jour avec ses potes rend les journées tellement sympas. J'espère que cette ambiance amicale perdurera et que le pacte de « bonne entente entre thésards » continuera d'être appliqué. Pour qu'il n'y ait pas de rivalité quant à la place de « collègue favori(te) » dans mes remerciements, vous serez nommés par ordre alphabétique :

AnaïsBis, désolée de ne pas t'avoir laissée être la seule Anaïs du labo. Les petites vidéos pour choisir ton bébé chien, ainsi que celles d'Éliot me manqueront. Mais je compte sur toi pour continuer à m'en envoyer ☺. Je te souhaite bon courage pour la troisième année et pour la suite.

Arthur, compagnon de la team « thésards de David », c'était très chouette de bosser avec toi. Encore toutes mes excuses de n'avoir pas été là pour ta thèse et surtout de t'avoir souhaité bon courage à la mauvaise date... Je garde de très bons souvenirs de l'ambiance de notre bureau lorsque j'arbitrais les tournois de boulettes de papier, tout autant que de nos échanges scientifiques toujours très riches. Merci aussi pour tous les complexes que tu auras générés chez nous par ton impressionnante veille bibliographique ☺. Je te souhaite de trouver ta voie et de t'épanouir autant professionnellement que personnellement.

Cyrille, merci d'avoir complété le groupe « arrive tard – part tard ». J'espère que les petits conseils de la vieille thésarde fatiguée et aigrie de 3^e année te seront utiles. Je suis contente d'avoir partagé les galères du quotidien en se disant mutuellement que, finalement, nos problèmes respectifs étaient négligeables face à ceux que l'autre rencontrait. Compagnon de situations compliquées, je te souhaite plein de belles choses pour la suite ! Je te préviens, à la fin de ta thèse, je tiens à lire le carnet des « choses apprises au cours du repas au labo ».

Hélène, merci pour tout ce que tu as organisé pour la cohésion sociale thésards et assimilés de l'équipe. Grâce à toi, je me suis immédiatement sentie intégrée à l'équipe. Contente d'avoir encore de tes nouvelles.

Jérémie, merci à toi pour ta bonne humeur et ta bienveillance, et surtout d'avoir initié notre petit groupe de squash. Malheureusement, après ton départ, nous n'avons pas réussi à continuer ; c'est dommage.

Lydie, après avoir partagé de chouettes moments à Rennes, c'est surtout à Boston qu'on a passé le plus de temps ensemble. Je vous remercie, toi et Nico, pour votre accueil à Boston. Mon séjour n'aurait pas eu la même saveur sans ça. C'était tellement agréable et rassurant d'avoir des amis sur place. J'ai tant bons souvenirs avec vous. Niagara Falls, les déjeuners entre deux manips, les soirées avec vos potes post-doc et collègues, Halloween... Encore merci pour tout cela et à très bientôt !

Mélo die, merci de m'avoir confié la suite de ton projet. Il n'a pas tout à fait pris la tournure que nous pensions ; j'espère que tu en es quand même satisfaite.

Nina (ou Mr Beaf), aïe aïe aïe ! Tellement de choses à dire que l'abstract de ces trois années est difficile à écrire. Tant de rigolades, potins, conversations scientifiques, etc. Merci d'avoir toujours été là pour moi, autant pour m'aider à écrire mes lettres de recommandation que pour m'accompagner à une soirée Potins-Chardonnay au Champs Jacquet. Désolée de ne m'être pas convertie à AhR, mais je vous aime bien quand même. Compte sur moi pour, même à distance, être la police du vocabulaire, et pour te rappeler à l'ordre quand tu ne réponds plus à aucun message. Même de loin, je vais rester vigilante. Une petite pensée pour Saponin et Jean-Eude qui auront animé nos nombreuses blagues privées. J'espère retravailler un jour avec toi. Mais comme je doute que ça soit le cas, je peux t'assurer qu'on n'a pas fini de se retrouver pour une session potins. Eh oui, je sais, je suis impardonnable, je n'ai pas assisté à ta soutenance de thèse... Mais parle pas si vite, la mienne sera en huis clos, donc tu n'y seras pas non plus, haha !

Merci aux autres membres de l'équipe, que vous en fassiez toujours partie ou que vous soyez occupés par de nouvelles aventures.

Anne, merci pour ta gentillesse, ta spontanéité et ta générosité. Toujours là pour nous faire sourire et nous apporter tes conseils, travailler à tes côtés est un plaisir, surtout lorsqu'il fallait faire un WB. Tes futurs collègues ont de la chance. Je

te souhaite plein de bonnes choses, et de t'épanouir dans ta vie professionnelle et familiale. Tu le mérites. Merci de m'avoir soutenue et toujours encouragée quand j'étais fatiguée ou stressée. Les moments passés avec toi en dehors du labo sont d'excellents souvenirs et j'espère qu'ils seront encore nombreux.

Anne-Gaëlle, merci pour ta gentillesse au quotidien et pour les petits mots d'encouragement que tu as toujours eus pour nous.

Hélo, merci pour ta bonne humeur, ta motivation de l'extrême en toutes circonstances pour passer de chouettes moments, et donc pour toutes les bonnes soirées que nous avons passées, aussi bien en petit comité qu'avec toute l'équipe chez toi. À très bientôt.

Lise Seb et Virginie je vous remercie pour les échanges scientifiques et pas que, que nous avons pu avoir. Votre passion pour la science a été source d'inspiration pour moi. Je vous souhaite beaucoup de succès dans vos futurs projets et vous remercie de la bienveillance que vous avez envers nous, les étudiants.

Une pensée aussi pour tous les stagiaires et scientifiques de passage qui se sont succédé à nos côtés. Je pense notamment à Antho qui m'a permis de présenter une table des matières correcte sans que je ne perde ma santé mentale. Mais aussi à Laure, toujours un plaisir de croiser ton sourire, et à Elie, pour nos matchs de squash toujours aussi sportifs ☺.

Je vous lègue le « Musée des horreurs ». Je laisse ma place de commissaire d'exposition, et, bien que je vous souhaite à tous tout plein de beaux résultats, n'oublions pas l'art et la culture !!!

J'adresse mes plus sincères remerciements à Marc-Henri. Tu as été le premier à m'accorder ta confiance quand, en L3 puis en M1, tu m'as accueillie dans ton équipe pour mes stages. Par la suite, tu m'as toujours apporté ton aide pour soutenir mes candidatures diverses et variées. C'est au sein de ton équipe que j'ai su que je voulais devenir chercheur. Je tiens donc à remercier chaleureusement Élodie, puis Manuel et Samar, qui ont été mes encadrants directs et m'ont formée quand je n'étais qu'un bébé stagiaire. Vous m'avez transmis la passion de la science par votre bienveillance. J'ai une pensée amicale également pour tous les membres de l'équipe MHS que j'ai côtoyés.

J'ai également eu la chance de m'essayer à l'encadrement de stagiaires. Merci à David de m'avoir épaulée dans cette mission et, surtout, merci à Delphine d'avoir été indulgente lorsque je tâtonnais. J'espère t'avoir transmis ma passion pour la science, comme les précédents cités l'ont fait avec moi. Je suis fière de savoir que tu vas reprendre le flambeau grâce à la bourse de thèse que tu as décrochée.

Durant mon travail de thèse, j'ai eu l'inestimable chance d'être accueillie pour un stage de trois mois à Boston, dans l'équipe du Pr Pandolfi. I would like to thank all of you, members of the Pandolfi's lab, especially Riccardo. Thank you very much Riccardo for everything you taught me. I had a wonderful three months in Boston thanks to you. You trusted me as if I had been there for a long time. You let me test all the wildest ideas and made me feel much more confident. Thank you for your encouragement.

My stay in Boston could not have been so perfect without Jacalyn and Raphy. I would never have expected to meet such generous people. You more than welcomed me into your home, you welcomed me into your family. I am infinitely grateful to you. I promise I will come back to see you. Thank you very much Arianna for introducing them to me but also for your funny English courses.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'IGDR avec qui j'ai pu échanger. Nous avons la chance de travailler dans une ambiance très formatrice. Il est facile d'interagir avec tous et c'est un vrai plaisir. Un merci tout spécial à Géraldine et la Gestion : Nadine, Isabelle, Rolande, Erwan et Nathalie. Mention spéciale pour Nadine qui a réussi, par tous ses efforts et bons plans, à activer la Poste pour retrouver mon passeport et à me trouver un vol pour Boston. Merci à Philippe de nous accueillir toujours aussi gentiment dans son magasin. Et merci à Karen pour son aide précieuse à la laverie.

Je tiens également à remercier Marie-Laure Pinel, Cédric Coulouarn, ainsi que Martin Dutertre d'avoir fait partie de mon comité de thèse, et de m'avoir conseillée au cours de ces deux réunions.

Merci à Anne pour son remarquable travail de relecture.

Autant d'investissement dans la vie professionnelle ne pourrait avoir lieu sans le soutien sans faille de la famille et des amis.

Je remercie tous mes amis qui sont passés (ou qui passent) par là, que ce soit en bio ou dans d'autres disciplines. Merci de m'avoir encouragée, d'avoir compati, d'avoir compris et, surtout, de ne pas m'avoir avoué dès le début comme c'était dur. J'adresse donc mes plus sincères remerciements accompagnés de mes félicitations à Alexandre, Olivier, Julien et Dimitri.

Une mention tout particulière pour Dimitri qui supporte toutes mes jérémiades trop souvent et qui partage, même à distance, les galères de la thèse. Je te souhaite le meilleur pour la fin de la tienne. Tout plein de courage.

Et comme il est essentiel d'avoir une vie en dehors de la science et du labo, j'ai la chance inestimable d'être entourée d'amis fidèles : Agathe, Alex, Alexia, Chloë, Clémence, Katia, Olivia, Justine, Tugdual, Kara, Laetitia, Antoine, JB, Charline, Maxime, Aurélia... Pour celles avec qui j'ai passé le plus de temps, j'ai la chance de compter leurs parents également comme amis. Je remercie aussi Isabelle, Philippe, Françoise et Philippe, Anne (car elle ne fait pas que corriger ☺) et Bernard pour leurs encouragements depuis qu'ils me connaissent, arpentant les chemins de Kerbertin. Je remercie encore chaleureusement et adresse mes plus plates excuses à ceux ou celles que j'aurais pu oublier ...

À mon tour d'avoir une pensée toute particulière pour toi, Yannick. Tu m'as rendu la pareille en m'accompagnant durant ma thèse, même en étant de l'autre côté de l'Atlantique. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir encouragée, de m'avoir fait grandir parfois à grands coups de pied aux fesses quand c'était nécessaire. Merci surtout de m'avoir ouverte à la science en général, plutôt qu'à la bio en particulier. Et merci pour nos chouettes aventures.

Vient maintenant le moment de remercier plus que chaleureusement ma famille. Je n'ai jamais vu autant de fierté à mon égard que dans vos yeux.

En tout premier lieu mes parents. Je mesure aujourd'hui la chance d'avoir eu un soutien sans faille, à la fois matériel où tout a été fait pour mon confort et ma réussite, et moral où j'ai été écoutée et soutenue dès que j'en ai eu besoin. Maman et Éric, j'ai de la chance de vous avoir. MERCI !

À ma sœur, seule Quéméner de la troupe, merci pour cet enthousiasme à chacune de mes réussites et pour ton soutien quand le moral descend. Je suis moi aussi très fière de toi. Une pensée particulière à ta maman également. Merci d'être fière de moi.

À mes oncles, tantes et cousins : Flo, Maryse, Marc, Catherine, Éliane, Jean-Yves, Théo, Vincent, Anne-Laure, Guélor, Christine, merci de m'encourager.

À tout le « clan » Rogard : Tatane, Pierrot, Noëlle, Hélène, Philippe, Marie Josée ; merci d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir tenté de combler le vide immense laissé par Papy et Mamie. Merci également à Véronique qui m'aura toujours considérée comme sa petite-fille, et qui est également comme ma grand-mère.

Merci à Laure et sa famille : Isa, JB, Agnès et JC, ainsi que Jo et Vinch ; depuis le temps, j'ai comme l'impression d'avoir été adoptée. Nos conversations quotidiennes sont pour moi une petite distraction indispensable. Vous m'avez tellement apporté, merci. Je remercie également vos grands-parents qui, eux aussi, m'avaient adoptée.

À tous, j'aurais tellement aimé vous voir le jour de ma soutenance. J'ai été tellement touchée par votre enthousiasme pour vous libérer et venir célébrer avec moi... Ce n'est que partie remise.

Mes dernières pensées iront à ceux qui ne sont plus et qui ont laissé un immense vide. Tout d'abord Jean-Yves qui, avant de partir, m'aura donné la plus grande des motivations pour toujours travailler plus dur.

Et pour finir, à vous, Papy et Mamie. Personne ne pourra jamais être plus fiers de moi que vous ne l'avez été. Je regrette seulement que vous ne puissiez voir l'aboutissement de tout le travail que vous m'avez encouragée à fournir. Je vous l'assure, j'ai fait de mon mieux.

Table des matières

TABLE DES FIGURES	7
TABLE DES TABLEAUX	7
PREAMBULE	- 13 -
INTRODUCTION	- 15 -
PREMIERE PARTIE : LES MIARN, REGULATEURS TRANSCRIPTOMIQUES ISSUS DU GENOME NON CODANT	- 17 -
1 LES ARN NON CODANTS.....	- 17 -
1.1 L'ARN INTERFERENCE	- 19 -
1.2 LES MIARN	- 20 -
2 ÉVOLUTION ET CONSERVATION DES MIARN	- 20 -
3 NOMENCLATURE.....	- 22 -
3.1 NOMENCLATURE UNIFORMISEE DES MIARN	- 22 -
3.2 LES FAMILLES DE MIARN	- 24 -
3.3 LES ISOMiR.....	- 25 -
3.3.1 ISOMiR FORMES A PARTIR DU BRIN PASSAGER	- 25 -
3.3.2 ISOMiR FORMES A PARTIR D'UN CLIVAGE ALTERNATIF DE DROSHA OU DICER	- 26 -
3.3.3 ISOMiR ISSUS DE MODIFICATIONS POST TRANSCRIPTIONNELLES	- 26 -
4 ORGANISATION GENOMIQUE ET TRANSCRIPTION	- 28 -
4.1 LOCUS GENOMIQUE.....	- 28 -
4.2 TRANSCRIPTION DES MIARN.....	- 30 -
4.3 BOUCLE DE RETROCONTROLE DE LA TRANSCRIPTION DES MIARN	- 31 -
5 BIOGENESE DES MIARN.....	- 33 -
5.1 CLIVAGE DU PRI-MIARN.....	- 34 -
5.2 REGULATION DU MICROPROCESSEUR	- 37 -
5.3 EXPORTATION NUCLEAIRE	- 38 -
5.4 CLIVAGE DU PRE-MIARN.....	- 38 -
5.5 FORMATION DU MIARN MATURE.....	- 39 -
5.5.1 SELECTION DU BRIN GUIDE.....	- 39 -
5.5.2 ASSEMBLAGE DU COMPLEXE RISC	- 40 -
6 VOIES ALTERNATIVES DE BIOGENESE DES MIARN	- 41 -
6.1 MIARN DONT LA BIOGENESE EST INDEPENDANTE DE DICER	- 42 -
6.2 LES MIRTRONS	- 42 -
6.3 MIARN DERIVES DES ARN DE TRANSFERT	- 43 -
6.4 MIARN DERIVES DE SNOARN.....	- 44 -

6.5	LES AGOTRONS	- 44 -
6.6	ENDO-SIARN ET ENDO-SHARN	- 45 -
7	STRESS CELLULAIRE ET REGULATION DE LA BIOGENESE DES MIARN	- 46 -
7.1	AUGMENTATION DE LA BIOGENESE DES MIARN	- 47 -
7.2	INHIBITION DE LA VOIX DE BIOGENESE DES MIARN	- 47 -
8	DYNAMIQUE DU METABOLISME DES MIARN	- 48 -
8.1	STABILITE DES MIARN.....	- 48 -
8.2	RECYCLAGE ET DEGRADATION DES MIARN	- 49 -
9	MODES D’ACTION DES MIARN	- 50 -
9.1	REGULATION DE L’EXPRESSION DES GENES.....	- 51 -
9.1.1	DEGRADATION DIRECTE DE L’ARN CIBLE	- 51 -
9.1.2	REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE PAR DESTABILISATION DE L’ARNM ET INHIBITION DE LA TRANSCRIPTION.....	- 51 -
9.2	RECONNAISSANCE DE LA CIBLE.....	- 53 -
9.2.1	MRE CANONIQUES	- 53 -
9.2.2	MODELE PROPOSE DE LA RECONNAISSANCE DE LA CIBLE PAR LES MIARN AU NIVEAU DES MRE CANONIQUES	- 55 -
9.2.3	MRE NON CANONIQUES	- 56 -
9.2.4	DES SNP QUI CONDUISENT A LA FORMATION DE NOUVEAUX MRE.....	- 57 -
9.3	FONCTIONS NON CLASSIQUES DES MIARN.....	- 58 -
10	PREDICTIONS BIO-INFORMATIQUES DES CIBLES DE MIARN ET CONFIRMATION BIOLOGIQUE	- 59 -
10.1	PREDICTIONS BIO-INFORMATIQUES.....	- 59 -
10.2	VALIDATIONS BIOLOGIQUES.....	- 60 -
10.2.1	IMMUNO-PRECIPITATION POUR IDENTIFIER LES ARN LIES AUX MIARN	- 60 -
10.2.2	TECHNOLOGIE MS2-RIP POUR IDENTIFIER LES MIARN LIES A UN ARN DONNE	- 61 -
10.2.3	TECHNOLOGIE DU MIARN BIOTINYLE POUR IDENTIFIER LES ARN LIES A UN MIARN DONNE -	62 -
10.2.4	SUREXPRESSION OU SOUS EXPRESSION DU MIARN POUR IDENTIFIER SES PARTENAIRES .-	62 -
10.2.5	VALIDATION DES MRE PAR DES GENES RAPPORTEURS	- 62 -
10.3	PROPORTION DES DIFFERENTS TYPES DE MRE.....	- 63 -
10.3.1	ABONDANCE DES MRE CANONIQUES.....	- 63 -
10.3.2	ABONDANCE DES MRE NON CANONIQUES ET LEURS CONSEQUENCES.....	- 64 -
11	RESEAU DE MIARN, CEARN ET EPONGES A MICROARN	- 64 -
11.1	LES EPONGES A MIARN ARTIFICIELLES.....	- 65 -
11.2	COMPETITION ENDOGENE POUR LA LIAISON DES MIARN	- 65 -
11.2.1	LES PSEUDOGENES PEUVENT ETRE DES CEARN	- 66 -
11.2.2	LES ARNLNC PEUVENT ETRE DES CERNA	- 67 -
11.2.3	CIRCARN COMME CEARN	- 68 -
11.3	ÉPONGE A MIARN ENDOGENES.....	- 69 -
11.4	« LANGAGE DES MRE »	- 70 -
	DEUXIEME PARTIE : DU MELANOCYTE AUX MELANOMES UVEAUX.....	- 73 -
1	LES MELANOCYTES ET LA PRODUCTION DE MELANINE.....	- 73 -

1.1	ORIGINE DES MELANOCYTES	- 73 -
1.2	LA PRODUCTION DE MELANINE	- 73 -
1.3	LOCALISATION DES MELANOCYTES	- 74 -
1.3.1	LES MELANOCYTES CUTANES	- 75 -
1.3.2	LES MELANOCYTES NON CUTANES	- 76 -
2	LE MELANOME UVEAL	- 79 -
2.1	ÉPIDEMIOLOGIE DES MELANOMES UVEAUX	- 80 -
2.1.1	LES FACTEURS DE RISQUES.....	- 81 -
2.2	GENETIQUE DES MELANOMES UVEAUX	- 82 -
2.2.1	ALTERATIONS CHROMOSOMIQUES.....	- 83 -
2.2.2	MUTATIONS.....	- 84 -
2.2.3	LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LE MELANOME UVEAL.....	- 89 -
2.3	DIAGNOSTIC, PRONOSTIC ET EVOLUTION METASTATIQUE.....	- 92 -
2.3.1	DIAGNOSTIC.....	- 92 -
2.3.2	L'EVOLUTION METASTATIQUE CONDITIONNE LE PRONOSTIC	- 92 -
2.4	TRAITEMENTS.....	- 94 -
2.4.1	LES TUMEURS PRIMAIRES.....	- 94 -
2.4.2	LES TUMEURS METASTATIQUES.....	- 95 -
	PARTIE 3 : MIARN & CANCER.....	- 99 -
1	ROLE DES MIARN DANS LE CANCER	- 99 -
1.1	MIARN AVEC UNE ACTIVITE ONCOGENIQUE	- 100 -
1.2	MIARN AVEC UNE ACTIVITE SUPPRESSEUR DE TUMEUR.....	- 100 -
2	LES MIARN COMME BIOMARQUEURS	- 102 -
2.1	L'EXPRESSION DES MIARN	- 102 -
2.2	LES MIARN CIRCULANTS	- 103 -
3	LES MIARN COMME OUTIL THERAPEUTIQUE.....	- 103 -
3.1	LES INHIBITEURS DE MIARN.....	- 104 -
3.2	LES MIRNA SYNTHETIQUES THERAPEUTIQUES	- 104 -
3.3	AUTRES STRATEGIES THERAPEUTIQUES QUI CIBLENT LES MIARN	- 105 -
4	L'IMPLICATION DU MIR-16 DANS LE PROCESSUS TUMORAL	- 105 -
5	MIARN ET MELANOME UVEAL	- 107 -
	OBJECTIFS	- 111 -
	RESULTATS	- 119 -
	RESULTATS 1 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	- 121 -
	NOUVEAU ROLE FONCTIONNEL DES MIARN DETERMINE PAR UN APPARIEMENT NON CANONIQUE, IMPLIQUE DANS L'AGRESSIVITE DU MELANOME UVEAL.....	- 121 -

RESULTATS 2 : REVUE.....	- 125 -
LE MONDE PUISSANT DES OLIGONUCLEOTIDES ANTI-SENS : DE LA PAILLASSE AU LIT DU PATIENT.....	- 125 -
CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	- 127 -
BIBLIOGRAPHIE.....	- 141 -
ANNEXE.....	- 167 -

Table des figures

Figure 1 : Différentes classes d'ARN non codants contenus dans le transcriptome humain	- 19 -
Figure 2 : Distribution des miARN dans le règne animal.....	- 21 -
Figure 3 : Nomenclature des miARN selon les espèces	- 23 -
Figure 4 : Illustration d'une famille de miARN.....	- 25 -
Figure 5 : Locus génomique des gènes de miARN.....	- 29 -
Figure 6 : Une tige boucle peut aider une autre boucle atypique lorsqu'elle se trouve à proximité. -	30 -
Figure 7 : Boucle de régulation négative entre un miARN et un facteur de transcription	- 32 -
Figure 8 : Boucle de régulation positive qui active sa propre transcription.....	- 32 -
Figure 9 : Boucle de régulation impliquée dans la leucémie myéloïde aiguë.	- 33 -
Figure 10 : Biogénèse des miARN.....	- 34 -
Figure 11 : Reconnaissance de la tige boucle par le microprocesseur	- 36 -
Figure 12 : Modèle de l'activité de Dicer.	- 39 -
Figure 13 : Caractéristiques des brins conduisant à la sélection du brin guide et du brin passager. -	40 -
Figure 14 : Schéma des différentes voies de biogénèse des miARN non canoniques.....	- 46 -
Figure 15 : Recyclage et dégradation du miARN par le mécanisme TDMD ou TumiD.....	- 50 -
Figure 16 : Appariement central entraînant un clivage de la cible.....	- 51 -
Figure 17 : Schéma du mécanisme de répression des ARNm médié par les miARN	- 52 -
Figure 18 : Illustration des différents MRE.....	- 55 -
Figure 19 : Schéma du modèle proposé par David Bartel pour la reconnaissance d'un MRE canonique ou central par un miARN.....	- 56 -
Figure 20 : Représentation schématique des appariements non canoniques de type central et wooble... -	57 -
Figure 21 : Proportion respective des différents sites de localisation des MRE	- 64 -
Figure 22 : L'efficacité d'un miARN est dépendante de la TSA	- 66 -
Figure 23 : Formation des circARN.....	- 68 -
Figure 24 : Régulation réciproque entre les miARN et les ARNm	- 71 -
Figure 25 : Les mélanocytes sont retrouvés dans divers endroits du corps humain.....	- 74 -
Figure 26 : Représentation schématique de l'œil.....	- 78 -
Figure 27 : Anatomie de l'œil.....	- 81 -
Figure 28 : Profil de mutation du mélanome uvéal	- 83 -
Figure 29 : Les protéines G α sont divisées en 4 familles : αs , αi , αq et $\alpha 12$	- 85 -
Figure 30 : Représentation schématique des mutations drivers du mélanome uvéal.....	- 86 -
Figure 31 : Cascade d'activation de la voie de signalisation MEK/ERK.....	- 89 -
Figure 32 : Représentation schématique de l'activation de YAP par les mutations de GNAQ/GNA11. -	91 -
Figure 33 : Risque métastatique en fonction des mutations (adapté de Alsafadi et al., 2018).....	- 94 -

Table des tableaux

Tableau 1 : Nomenclature des différents précurseurs des miARN.....	- 24 -
Tableau 2 Récapitulatif des différents miARN non canoniques en fonction de leur dépendance aux enzymes Drosha et Dicer pour leur biogénèse. miARN : microARN, snoARN : small nucleolar ARN, endo-shARN : endo-short-hairpin ; endo-siARN : endo-short-interfering ARN.....	- 45 -

Abréviations

3'UTR : Région 3' non traduite (3' Untranslated Transcribed Region)	CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein alpha
A : Adénosine	CLASH : Crosslinking, Ligation, and Sequencing of Hybrids
A en I : Adénosine en Inosine	CLEAR CLIP : covalent ligation of endogenous Argonaute-bound RNA- CLIP
ADAR : Adenosine deaminase acting on RNA	CLIP-Seq : Crosss-Linking ImmunoPrecipitation Sequencing
ADN : Acide désoxyribonucléique	CNV : copy number variant (variation du nombre de copies)
Ago : Argonaute (protéine)	COX2 : cyclo-oxygénase
AGO-IP : Immunoprécipitation d'Ago	CRISPR-Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ARF6 : ADP-ribosylation factor 6	CYSLTR2 : Cysteinyl Leukotriene Receptor 2
ARN : Acide ribonucléique	DAG : diacyglycérol
ARNce : compétiteur endogène ARN	DBR1 : RNA lariat debranching enzyme
ARNlnc : ARN long non codant	DDX6 : DEAD-box helicase 6
ARNm : ANR messenger	DGCR8 : DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
ARNnc : ARN non codants	DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine
ARNr : ARN ribosomaux	E. Coli : Escherichia coli
ARNsn : petit ARN nucléaire (small nuclear RNA)	EIF1AX : Eukaryotic translation initiation Factor 1A, X-chromosomal
ARNsno : petit ARN nucléolaire (small nucleolar RNA)	EIF4E : Eukaryotic translation initiation factor 4e
ARNt : ARN de transfert	EIF4G : Eukaryotic translation initiation factor 4 G
ASO : Antisense oligonucleotide	ENCODE : Encyclopedia of DNA Elements
BAP1 : BRCA1 associated protein-1	ERK : Extracellular signal-regulated kinases
BIC : B Cell integration cluster	Exp5 : Exportine 5
BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4	FSTL1 : Follistatine-like 1
CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein alpha CEBPA	FXR1 : Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
C.Elegans : Caenorhabditis elegans	GDP : guanosine diphosphate
C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins	
CAR : Chimeric Antigen Receptor	
CCND1 : Cycline D2	
CCND3 : Cycline D3	
CCR4 carbon catabolite repressor 4	
CCR4-NOT : Carbon Catabolite Repression—Negative On TATA-less	
CDK9 : Cyclin dependant kinase 9	
CDR1 as Cerebellar degeneration- related protein 1 anti sens	

GEF : Guanine nucleotide exchange factors
GNA11 : G protein subunit alpha 11
GNAQ : G protein subunit alpha q
GTP : guanosine triphosphate
hnRNPs E2: Ribonucléoprotéine hétérogène E2
HULC : Highly up-regulated in liver cancer
I : Inosine
iCLIP : l'individual-nucleotide resolution
UV-crosslinking and immunoprecipitation
IGF1 : Insulin-like growth factor-1
IP3 : inositol 1,4,5 triphosphate
IPS1 : Inositol-3-phosphate synthase isozyme 1
KSRP : KH-type splicing regulatory protein
LATS1/2 : Large tumor suppressor kinase 1/ 2
LLC : leucémie lymphoïde chronique
MALM2 : Maltose operon periplasmic protein
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCL1 : myeloid cell leukemia 1
MEF2C : Myocyte Enhancer Factor 2C
miARN : micro ARN
MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor
MRE : Élément de réponse au miARN (miRNA Response Elements)
MS2-RIP : Immuno précipitation des motifs MS2
mTOR : mammalian target of rapamycin
NF45 : Nuclear factor 45
NF90 : Nuclear factor 90
NFI-A : Nuclear factor 1 A-type
NOT : Negative on TATA
ORF : Open reading frame
PABPC : cytoplasmic poly(A) binding protein
PAN2 : poly(A)-nuclease 2
PAN3 poly(A)-nuclease 3
PAR-CLIP : Photoactivatable

-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation
PARN : Poly(A)-specific ribonuclease
PAZ : Piwi-Argonaute-Zwille
PDX: Patient-derived xenograft
PI3K : Phosphoinositide 3-kinases
piARN : ARN qui interagit avec PIWI (PIWI-interacting RNA)
PKC : Protéine Kinase C
PLC : PhosphoLipase C
PLCB4 : PhosphoLipase C beta 4
pré-miARN : précurseur de miARN
pri-miARN : ARN primaire
PRKACB : Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Beta
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTENP1 : Phosphatase and TENsin homolog Pseudogene 1
RBM10 : RNA Binding Motif Protein 10
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RISC : RNA-induced silencing complex
RMN : résonance magnétique nucléaire
ROS : Reactive oxygen species
sARN : petit ARN small ARN
SF3B1 : Splicing Factor 3b Subunit 1
siARN : small interfering ARN
SNV : Single nucleotide variant (mutations d'un seul nucléotide)
TAZ : Tafazzin
TDMD : Dégradation de miARN dirigée par les cibles ARNTarget
RNA-directed microRNA degradation
TGFb : Transforming growth factor beta
TNFa: Tumor necrosis factor alpha
TNMD : target-directed miRNA protection
TNRC6 : trinucleotide repeat containing 6
TNS : Tudor-SN
TRBP: transactivation response element RNA-binding protein
TSA :target site abundance

TSB : Target Site Blocker

Tumid ; Tudor-SN-mediated miRNA
endonucleolytic decay

TUTase : 3' uridylyl transferase

TYRP1 : Tyrosinase related protein 1

UV: ultra-violets

YAP : Yes associated protein

Préambule

Cette thèse porte sur l'étude de l'activité post-transcriptionnelle des microARN (miARN) dans le contexte tumoral. Les miARN sont des petits ARN non codants (ARNnc), dont la taille est d'environ 22 nucléotides. Ce sont des régulateurs transcriptionnels négatifs majeurs. En effet, on estime qu'au moins 60 % des acides ribonucléiques (ARN) codants sont négativement régulés par des microARN (Bartel, 2004 ; Friedman et al., 2009).

Ces petits ARNnc régulent le niveau d'expression des gènes par hybridation séquence spécifique sur leur cible ARN. Cette spécificité est déterminée principalement par la séquence de la région *seed* des miARN qui correspond aux nucléotides 2 à 7. Ils s'hybrident sur les ARN pour en réguler l'expression au niveau d'un élément de reconnaissance du miARN (MRE) (Bartel, 2004, 2018).

De nombreux travaux ont montré que les miARN pouvaient également s'hybrider sur d'autres ARN. La quantité de miARN dans la cellule étant limitée, ces ARN sont en compétition avec les cibles classiques. On parle d'ARN compétiteurs endogènes (ARNce). Cela définit un réseau qui comprend l'ensemble des partenaires d'un miARN. Les miARN sont, à la fois, relativement stables et fortement exprimés ; néanmoins, leur activité est régulée notamment par la liaison à ces ARN (Salmena et al., 2011).

Ce travail de thèse vise à mieux comprendre comment l'activité d'un miARN régule le transcriptome. Pour cela, j'ai établi une partie du targetome du miR-16, puissant suppresseur tumoral dans le mélanome uvéal. Le targetome correspond, par définition à l'ensemble des ARN dont la liaison du miARN entraîne la dégradation, c'est-à-dire les cibles du miARN. Il peut toutefois être aussi considéré comme l'ensemble des partenaires du miARN. Je me suis focalisée principalement sur les ARN messagers (ARNm). La première partie de ce travail décrit les miARN depuis leur biogénèse jusqu'à leur fonctionnement, tandis que la deuxième partie présente le modèle de cette étude : le mélanome uvéal et les enjeux thérapeutiques.

Introduction

*Première partie : Les miARN, régulateurs
transcriptomiques issus du génome non
codant*

1 Les ARN non codants

Le génome des mammifères compte environ 3×10^9 paires de bases, ce qui représente près de 600 fois plus que le génome de la bactérie *Escherichia coli* (*E. Coli*), qui n'en compte qu'environ 5×10^6 ¹. Il était assez tentant de penser que le nombre de gènes d'un organisme était corrélé à la taille de son génome. Avec cette estimation, le génome humain devrait contenir environ 3 millions de gènes. Ce n'est en réalité, pas le cas. Le génome humain compte seulement un peu plus 20 000 gènes codants² et on en trouve moins de 6 000 pour *E. Coli*.

Ces notions ont fait l'objet de nombreuses études pour tenter d'élucider ce qui a été nommé le « Paradoxe C » ou parfois « Énigme C ». La valeur C correspond à la quantité d'Acide désoxyribonucléique (ADN) dans le noyau (haploïde) d'une cellule. Ce paradoxe met en évidence l'absence de corrélation entre la taille du génome et la complexité de l'organisme (Slijepcevic, 2018).

Le projet *Encyclopedia of DNA Element* (ENCODE) apporte quelques éléments de réponse. Il est soutenu par un consortium international et a pour objectif d'établir une liste, la plus exhaustive possible, des éléments contenus dans le génome humain (Feingold et al., 2004). ENCODE a mis en évidence qu'entre 70 et 90 % du génome est transcrit (Djebali et al., 2012), mais que seulement ~ 2 % du génome codent des

¹ : http://bacteria.ensembl.org/Escherichia_coli/Info/Annotation/#about

² : http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Annotation

protéines (Lander, 2011). Ce paradoxe comporte notamment un biais important. En effet, les ARNnc ne sont pas pris en compte. Pendant de nombreuses années, cette partie non codante du génome a été considérée comme n'ayant aucun rôle biologique. Ceci lui a même valu d'être baptisée ADN poubelle, « *Junk DNA* » en anglais. Cette expression est souvent attribuée à Susumu Ohno (Ohno, 1972), alors qu'elle est apparue dès les années 60 (Ehret & De Haller, 1963). Cette appellation est à la fois erronée et péjorative. En effet, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence que cette portion du génome a de nombreuses fonctions essentielles. Cet ADN, aussi qualifié de « matière noire » (« *Dark matter* » en anglais), est donc maintenant reconnu sous le nom de génome non codant, et les ARN qui sont issus de la transcription de ce génome sont désignés par ARNnc. Ces derniers sont divisés en plusieurs sous-catégories qui dépendent de leur fonction dans la cellule et de leur taille. En effet, on distingue deux grandes classes : d'une part, les ARNnc de ménage comprenant les ARN ribosomiaux (ARNr), les ARN de transfert (ARNt), les petits ARN nucléaires (ARNsn pour « *small nuclear* » en anglais), et les petits ARN nucléolaires (ARNsno pour « *small nucleolar* » en anglais) ; et d'autre part, les ARN régulateurs. Ceux-ci sont subdivisés en deux sous-catégories selon leur taille. Les longs ARN non codants (ARNlnc), dont la longueur est généralement supérieure à 200 nucléotides, et les petits ARN non codants inférieurs à 200 nucléotides. Cette dernière catégorie comporte, entre autres, les microARN (miARN) (Figure 1) (Djebali et al., 2012 ; Losko et al., 2016 ; Uchida & Dimmeler, 2015).

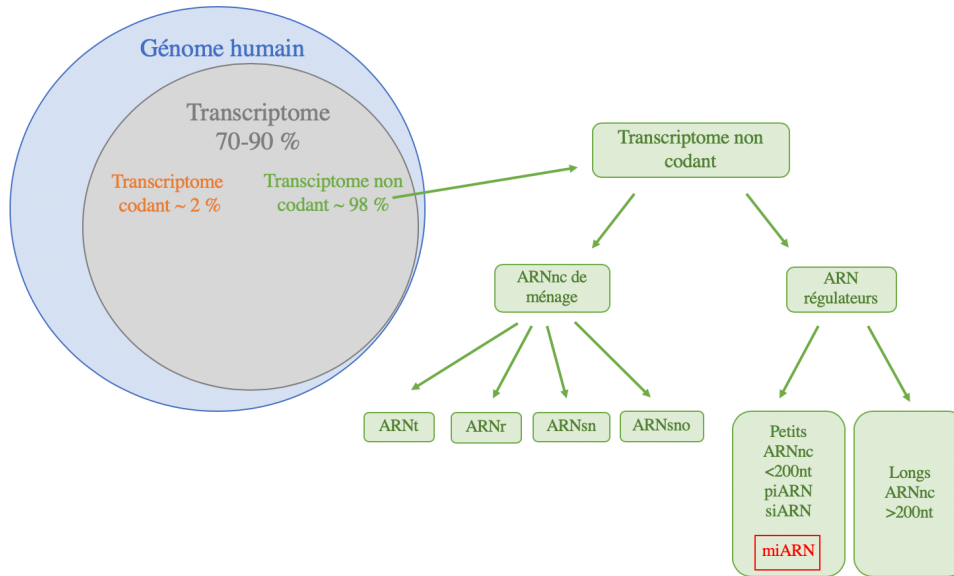


Figure 1 : Différentes classes d'ARN non codants contenus dans le transcriptome humain (adaptée de Uchida, 2015). *ARNnc* : ARN non codant, *ARNt* : ARN de transfert, *ARNr* : ARN ribosomiaux, *ARNsn* : ARN small nucléaire (petit ARN nucléaire), *ARNsno* : ARN small nucléolaire (petits ARN nucléolaires), *piARN* : PIWI interacting ARN (ARN qui interagissent avec PIWI), *siARN* : small interfering RNA (petit ARN interférence), *miARN* : microARN, *nt* : nucléotides.

1.1 L'ARN interférence

Le premier mécanisme d'ARN interférence a été mis en évidence fortuitement chez la plante, en 1990. L'objectif initial de cette étude était de renforcer la couleur pourpre des pétunias en introduisant un vecteur codant pour le gène responsable de cette coloration. De façon surprenante, les fleurs ne sont pas devenues plus colorées mais blanches ou partiellement blanches. On parle à l'époque de co-suppression sans expliquer précisément le phénomène (Napoli et al., 1990). Quelques années plus tard, Andrew Fire et Craig Mello montrent, chez le ver *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*), que l'on peut inhiber spécifiquement l'expression d'un gène par l'introduction d'un ARN double brin complémentaire de la séquence cible (Fire et al., 1998). On parle alors d'ARN interférence. Ces deux chercheurs ont été récompensés par le prix Nobel de physiologie ou de médecine en 2006.

1.2 Les miARN

En parallèle, des études menées chez le nématode *C. elegans* ont identifié des petits ARN interférents endogènes : les miARN. Le premier miARN fut découvert simultanément, en 1993, par deux équipes, celle de Victor Ambros et celle de Gary Ruvkun (Lee et al., 1993 ; Wightman et al., 1993). Le cycle de développement du nématode se structure en un stade embryonnaire, suivi de quatre stades larvaires (L1 jusqu'à L4), puis d'un stade adulte. Des études antérieures avaient montré que des mutants des gènes *lin-4* et *lin-14* étaient impliqués dans les différents stades du développement larvaire et qu'ils avaient des rôles antagonistes. Il avait également été suggéré que *lin-4* puisse réguler négativement *lin-14* (Ambros, 1989). En 1993, l'équipe de Victor Ambros montre que *lin-4* code deux transcrits d'environ 22 et 61 nucléotides, mais pas de protéine. Le plus remarquable est qu'une portion de la séquence de *lin-4* est complémentaire de la séquence du 3'UTR (*UnTranslated Region* ou région non traduite) de l'ARNm *lin-14* (Lee et al., 1993). Parallèlement, l'équipe de Gary Ruvkun révèle que *lin-4* régule *lin-14* *via* sa région 3'UTR (Wightman et al., 1993). Il s'agit de la première mise en évidence de l'existence de ces petits ARNnc chez le nématode. Aucune évidence de l'existence de ces structures chez l'homme n'avait jusqu'alors été décrite.

C'est en 2000 que l'étude de Reinhart et de ses collaborateurs révèle l'existence d'un autre petit ARN nommé *let-7*, toujours dans le modèle *C. elegans* (Reinhart et al., 2000). Des homologues de *let-7* ont été découverts chez d'autres organismes, faisant de *lin-4* et *let-7* les premiers découverts d'une longue série (Lagos-Quintana et al., 2001).

2 Évolution et conservation des miARN

Lors de la découverte des miARN chez le nématode, rien ne laissait présager que cette nouvelle famille d'ARN serait commune à plusieurs espèces. Plus tard, il s'est avéré que certains miARN découverts chez le ver étaient présents dans la majorité des espèces, dont l'homme (Lagos-Quintana et al., 2001). L'avènement du séquençage haut

débit, et notamment du séquençage des petits ARNnc, a permis de mettre en évidence leur existence au cours de l'évolution. Ils sont retrouvés très tôt chez des espèces très éloignées. Le miR-100, par exemple, est présent chez les Eumétazoaires et un set de 34 miARN est présent et conservé entre les Protostomes et les Deuterostomes (Figure 2) (Berezikov, 2011).

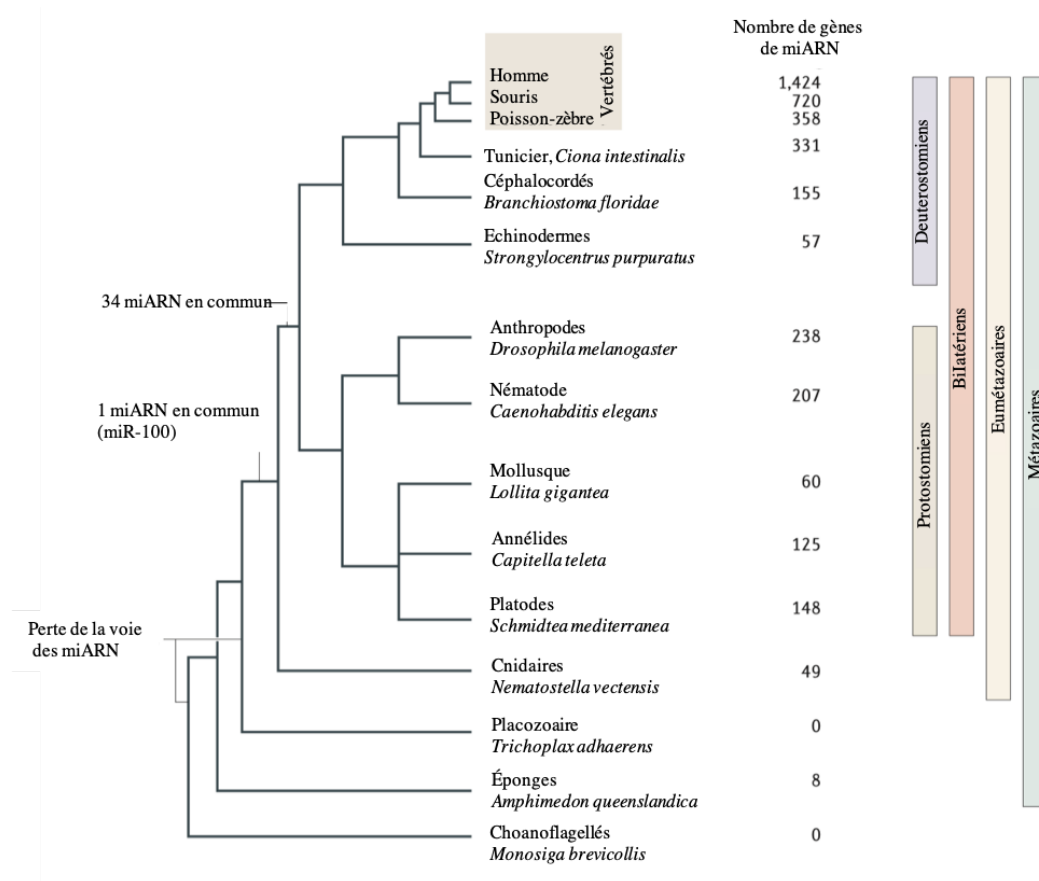


Figure 2 : Distribution des miARN dans le règne animal (adaptée à partir de Berezikov, 2011)

Bien qu'ils aient une biogénèse, une structure génomique et des propriétés différentes, des miARN sont également retrouvés chez les plantes et les algues. En effet, la structure secondaire de leurs précurseurs est beaucoup plus hétérogène que celle des métazoaires. Ils diffèrent aussi par leur mécanisme d'action. Majoritairement, les miARN des plantes sont parfaitement complémentaires de leurs cibles et donc régulent l'expression des transcrits, principalement par clivage direct de la cible, alors que ce mécanisme d'action est minoritaire chez les métazoaires, au profit de la dégradation de l'ARN et de l'arrêt de la traduction (leur mode d'action est détaillé dans le paragraphe « Mode d'action des miARN ») (Jones-Rhoades et al., 2006 ; Yekta et al., 2004). Les miARN des algues partagent de nombreuses caractéristiques avec les miARN des

plantes (Molnár et al., 2007). Cependant, les différences observées, additionnées au fait qu'ils ne soient pas retrouvés chez les champignons, suggèrent que les miARN des plantes et des algues n'ont pas la même origine que ceux des métazoaires (Grimson et al., 2008).

De façon intéressante, des miARN ont également été retrouvés chez les virus. Ces miARN viraux peuvent avoir une action sur les ARN de leur hôte et en moduler l'expression pour favoriser l'infection. À l'inverse, les bactéries ne semblent pas posséder de miARN. Elles possèdent pourtant des petits ARN régulateurs, appelés sARN pour small ARN. Ces petits ARN assurent notamment des fonctions régulatrices du métabolisme bactérien. Ils partagent des caractéristiques communes avec des miARN par leur fonction de régulation en se liant à des ARNm, par exemple. Toutefois, leur taille est variable ; de 50 à 600 nucléotides (Cardin & Borchert, 2017 ; Felden & Gilot, 2019).

Cette forte conservation tout au long de l'évolution témoigne de l'importance des miARN pour la régulation de l'expression des gènes. Les développements suivants de ce mémoire sont focalisés sur les miARN humains.

3 Nomenclature

3.1 Nomenclature uniformisée des miARN

Depuis leur découverte, plusieurs règles d'écriture se sont succédées. Il était nécessaire d'uniformiser les conventions d'écriture pour plus de clarté et éviter qu'un miARN puisse avoir plusieurs noms différents. Pour cela, un consensus vient d'être publié (Seal et al., 2020). Le paragraphe suivant décrit les conventions d'écriture actuellement utilisées pour nommer les miARN.

Certains miARN retrouvés chez les métazoaires ont été nommés en fonction de leur appellation chez d'autres espèces (lin-4 ou let-7 chez *C. elegans*, par exemple) ; mais la plupart des miARN ont été nommés, dans la mesure du possible, selon l'ordre de leur découverte avant que le séquençage à haut débit ne permette de séquencer tous les miARN (miARN-Seq). Les miARN communs à plusieurs espèces portent

normalement le même numéro. Initialement, les miARN portaient les 3 lettres « miR » suivies d'un numéro. Le gène qui code pour ce transcrit portait également ce nom. Mais les conventions d'écriture varient selon les organismes : utilisation de l'italique pour *C. elegans* (*miR-1*) et des majuscules pour *Arabidopsis* (MIR1). Il peut arriver que la séquence des miARN, bien que très proche, diffère de quelques nucléotides d'un organisme à l'autre, la conservation entre espèces n'étant pas toujours parfaite (Ambros et al., 2003). Suite à quelques confusions, notamment concernant les deux brins du microARN, mais également des isomiR, il a fallu clarifier les critères (Fromm et al., 2015).

Actuellement, pour distinguer les miARN des plantes de ceux des animaux, on utilise le tiret (-). En effet, alors que les miARN des animaux voient le préfixe « miR » séparé du numéro par un tiret, ce n'est pas le cas pour les plantes (par exemple, chez la plante : miR172 et chez les animaux miR-14). Ensuite, pour différencier l'organisme auquel appartient le miARN, l'espèce est précisée par trois lettres en préfixe du « miR » (Hikmet Budak, 2016) comme hsa-miR pour l'homme (Figure 3).

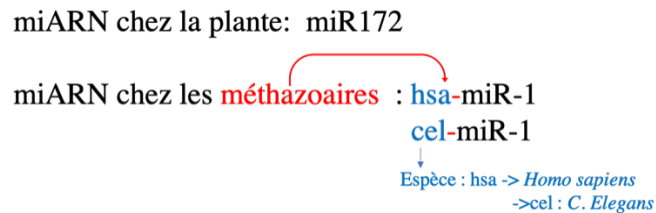


Figure 3 : Nomenclature des miARN selon les espèces

Les miARN sont répertoriés dans une base de données en ligne appelée miRBase¹, qui se veut aussi exhaustive que possible (Kozomara et al., 2019). Le but de cette base de données est de répertorier tous les miARN décrits dans la littérature, ainsi que leur séquence et la séquence de la tige boucle précurseur. miRBase a imposé quelques conventions d'écriture. À chaque miARN, tige boucle précurseur et brins du duplex sont associés un nom unique et une typographie bien particulière qui sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau 1) :

¹ <http://www.mirbase.org>

Tableau 1 : Nomenclature des différents précurseurs des miARN

	Exemples
miARN mature	hsa-miR-X
Brin 5'/brin 3'	hsa-miR-X-5p / hsa-miR-X-3p
Brin passager*	hsa-miR-X-(5 ou 3)p*
Tige boucle	hsa-mir-X
Gène Hôte	MIRX

Il se peut que deux gènes codent pour deux tiges boucles différentes, mais le miARN mature est identique. Dans ce cas, un numéro sera ajouté à la fin pour les gènes et pour la tige boucle (ex : « hsa-miR-16 » le miR mature, et ses deux précurseurs : hsa-mir-16-1 et hsa-mir16-2, on ajoutera les mêmes numéros aux gènes hôtes correspondants). Pour les paralogues, on notera des lettres pour différencier ces gènes (ex : MIR10A et MIR10B).

Plusieurs façons d'améliorer et de simplifier les annotations des microARN et des gènes hôtes sont à l'étude et régulièrement publiées pour tenter d'harmoniser et faire en sorte que toute la communauté adopte les mêmes conventions d'écriture (Seal et al., 2020). Pour terminer, afin d'identifier quel brin donnera le brin guide et quel autre brin donnera le brin passager, il est possible d'ajouter un « * », prononcé « étoile » ou « *star* » en anglais, au brin passager (ex : miR-16-3p*) (Bartel, 2018).

3.2 Les familles de miARN

Les miARN se regroupent sous le terme de famille. Le critère principal qui définit l'appartenance à une famille est la spécificité de sa cible. Celle-ci est définie selon la séquence *seed* du miARN. À titre d'exemple, la famille du miR-1/206 chez l'homme et la souris est composée des miR-1-1, miR-1-2 et miR-206 (voir Figure 4). Les gènes de cette famille sont des paralogues, c'est-à-dire issus de la duplication d'un même gène.

Famille miR-1/206

miR-1-1	uggaauguaaagaaguauguau
miR-1-2	uggaauguaaagaaguauguau
miR-206	uggaauguaaggaagugugugg

Région seed

Figure 4 : Illustration d'une famille de miARN (adaptée de King et al., 2014). La famille miR-1/206 est composée du miR-1-1, miR-1-2 et miR-206. La région seed est colorée en vert, et les bases colorées en jaune sont les différences entre les trois miARN.

Les membres d'une même famille ont souvent une origine commune. La réciproque est aussi vraie : les gènes ayant une origine commune appartiennent souvent à la même famille. La séquence *seed* (nucléotides 2 à 7) est retrouvée comme la plus conservée dans l'évolution. Il existe cependant des exceptions. Le miR-32 appartient à la famille miR-25/32/92/363/367 ; pour autant, il n'a pas la même origine que les autres membres de la famille. À l'inverse, les miR-200a et miR-200b diffèrent par un nucléotide dans la région *seed*. En conséquence, malgré leur origine commune, ils n'appartiennent pas à la même famille (Bartel, 2009, 2018 ; Lim et al., 2003).

3.3 Les isomiR

Un gène codant un miARN peut conduire à plusieurs isoformes du même miARN. Ces formes alternatives sont appelées isomiR. Il existe plusieurs processus responsables de leur formation.

3.3.1 IsomiR formés à partir du brin passager

Premièrement, un gène de miARN donne une structure tige-boucle qui, après maturation, formera un duplex composé d'un brin guide et d'un brin passager. Ce dernier est habituellement dégradé. Dans certains cas, ce brin passager peut aussi conduire à un miARN mature. Le brin passager étant partiellement complémentaire du brin guide, les deux ont donc des régions *seed* différentes et ne ciblent pas le même set de gènes. Ils n'ont, la plupart du temps, pas le même niveau d'expression (Bartel, 2018). Il y a alors deux possibilités : soit la tige boucle conduit à la production d'un miARN dominant provenant du bras 5' (majorité des cas), soit un miARN mature est

produit à partir des deux bras. Ce dernier cas est très minoritaire. Il est possible qu'un brin soit préférentiellement exprimé dans un tissu (Chiang et al., 2010).

3.3.2 IsomiR formés à partir d'un clivage alternatif de Drosha ou Dicer

Un clivage par Drosha ou Dicer « décalé » d'un ou quelques nucléotide(s) génère des miARN aux extrémités différentes. Ce décalage entraîne ainsi une *seed* différente, car elle est déterminée par la position des nucléotides 2 à 7. Ces isomiR sont très minoritaires.

En effet, les mécanismes de biogénèse et de sélection du brin guide sont bien régulés et permettent peu de flexibilité. On observe une plus grande hétérogénéité à l'extrémité 3', ce qui n'affecte pas la région *seed*. Néanmoins, les isomiR formés par une modification de l'extrémité 5' existent et sont suffisamment exprimés pour pouvoir réguler un ensemble de gènes (Bartel, 2018 ; Bofill-De Ros et al., 2019 ; Chiang et al., 2010).

3.3.3 IsomiR issus de modifications post transcriptionnelles

3.3.3.1 Modifications par les enzymes ADAR

Des modifications post-transcriptionnelles, comme la conversion d'une Adénosine (A) en Inosine (I) : (A en I), sont aussi à l'origine de la production d'isoformes de miARN. Ce phénomène épigénétique s'appelle l'édition d'ARN (ou « *RNA editing* » en anglais). Contrairement à l'Adénosine qui s'apparie à une Uracile, l'Inosine s'apparie avec une Cytosine. Si la conversion a lieu au niveau de la région *seed*, alors les cibles de ces isomiR seront différentes. De ce fait, l'ARN cible ne sera pas le même (Kawahara et al., 2007 ; Nishikura, 2016). Cette conversion A en I est effectuée par les enzymes adénosine désaminase (ADARs). Ces modifications sur les miARN matures sont très rares, mais diversifient grandement le panel des ARN cibles des miARN (Chiang et al., 2010 ; Felden & Gilot, 2019). Un atlas des modifications A en I a été publié récemment. Il identifie 574 sites d'édition sur des miARN matures, mais la majorité des sites d'édition se trouvent sur les pri-miARN (80 %) (Li et al., 2018). En effet, les protéines ADARs peuvent se lier à l'ARN double brin de la tige

boucle du pri-miARN (Felden & Gilot, 2019). L'édition du pri-miARN sera abordée dans un paragraphe consacré aux régulations de la biogénèse des miARN.

Une étude récente montre que le taux d'édition des miARN peut être différent entre le tissu sain et le tissu tumoral. En effet, les auteurs montrent que ce taux est inférieur dans les tumeurs. Les sites d'édition semblent également être différents (Pinto et al., 2018). Toutes ces études mettent en lumière le rôle important qu'ont les modifications post-transcriptionnelles sur l'expression des miARN, mais aussi *de facto* sur l'ensemble du transcriptome, cible des miARN.

3.3.3.2 Modifications par ajout ou élimination d'un nucléotide

Un autre mécanisme de modification post-transcriptionnelle peut également générer des isomiR. Ceux-ci sont dus à l'activité de terminal-nucléotides-transférase à l'extrémité 3' ou 5' ou de 3' exonucléases.

Lorsqu'un nucléotide est ajouté, il s'agit principalement d'un A ou d'un U. De plus, ces ajouts de nucléotides sont plus fréquents en 3' qu'en 5'. Quand ces modifications surviennent à l'extrémité 3', elles ne sont donc pas supposées avoir d'influence sur les cibles du miARN. Cependant, ces modifications peuvent influencer la stabilité des miARN (Ha & Kim, 2014 ; Kim et al., 2016).

L'ajout d'un U en 3' à une séquence ARN s'appelle l'uridylation. Elle est catalysée par des terminaluridylyltransférases (TUTase). De telles modifications peuvent avoir un impact sur l'activité des miARN. L'ajout d'un U à l'extrémité du miR-126-5p ou miR-379 réduit la régulation transcriptomique que ces derniers exercent sur l'*insulin like growth factor-1* (IGF-1) (Jones et al., 2012).

3.3.3.3 Modifications des miARN par méthylation

Parmi les nombreuses modifications de l'ARN identifiées, certaines, comme les méthylations, ont été identifiées sur les miARN. La N⁶méthyladénosine (m⁶A) a été décrite comme ayant une influence sur l'épissage, ainsi que sur la stabilité des ARN. Cette modification influence la biogénèse et l'expression des miARN (la biogénèse des miARN est détaillée dans le paragraphe 6). Les pri-miARN (miARN primaires), faisant

partie des précurseurs des miARN, sont riches en une séquence (GGAC) spécifiquement reconnue par les méthyltransférases ; ce qui favorise la reconnaissance de la structure par *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8* (DGCR8). Ces méthylations sont réversibles par l'activité des déméthylases spécifiques des m⁶A (Felden & Gilot, 2019).

4 Organisation génomique et transcription

4.1 Locus génomique

Les locus des miARN sont identifiés aussi bien dans des portions intergéniques qu'intragéniques. Les miARN intragéniques peuvent se situer dans des unités transcriptionnelles codantes ou non codantes. Saini et ses collaborateurs estiment qu'approximativement 50 % des loci se trouvent en dehors des gènes codants (Saini et al., 2007). Ce chiffre est évidemment susceptible d'évoluer en fonction de la découverte de nouveaux miARN. Plus tard, Di Leva et son équipe ont estimé que les miARN intragéniques ne représentent qu'une minorité des miARN (Di Leva et al., 2014). Lorsque ces loci se trouvent dans des gènes codants, ils se situent principalement dans les introns. Il existe, cependant, quelques loci présents dans des exons, qui représentent environ 10 % des miARN intragéniques (Di Leva et al., 2014). Cela concerne majoritairement des exons de gènes ne codant pas pour des protéines. C'est le cas, par exemple, du miR-155 dont le locus se situe dans un exon du gène *B Cell integration cluster* (*BIC*) ou du miR-198 dans le 3'UTR du gène codant pour la *Follistatine-like 1* (*FSTL1*) (Hinske et al., 2010 ; Ricotta & Frishman, 2012 ; Rodriguez et al., 2004).

Les gènes des miARN peuvent être isolés ou regroupés en cluster. Les gènes de miARN d'un même cluster semblent être transcrits de manière polycistronique. On parle donc d'ARN monocistronique (miR-210) s'il est isolé, s'il est regroupé en clusters d'ARN bicistronique (ex : miR-222/221) ou polycistronique (miR-17/92) (Figure 5). Environ 50 % sont issus de gènes polycistroniques (Di Leva et al., 2014 ; Lee et al., 2002). Les gènes sont considérés comme appartenant au même cluster s'ils sont distants de moins de 10 kilobases et orientés dans le même sens. Les clusters de gènes de miARN peuvent regrouper des miARN de la même famille ou de familles différentes. Ces

clusters sont dans environ 50 % des cas issus de duplication de gènes. Les autres sont dits *de novo* (Wang et al., 2016).

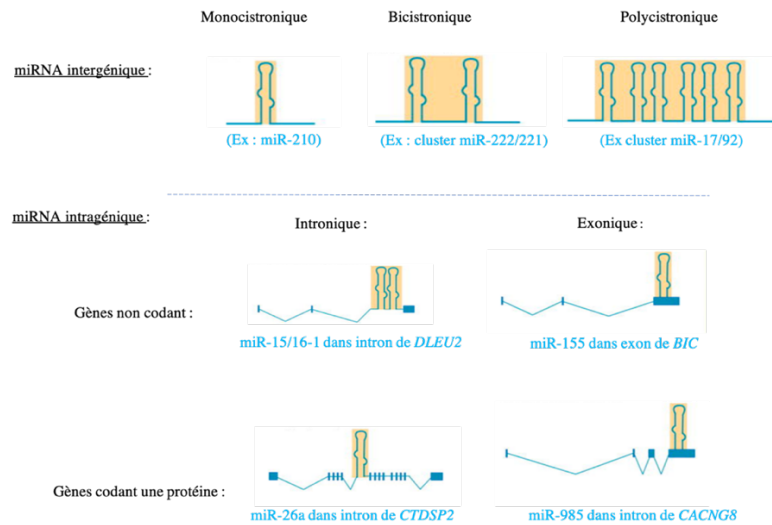


Figure 5 : Locus génomique des gènes de miARN (schéma adapté de Di Leva et al, 2014). Les gènes des miARN peuvent se localiser dans des régions inter- ou intra-génique (codant ou non) ; ces gènes peuvent être seuls ou regroupés en cluster.

L'équipe de David Bartel et celle d'Éric Lai ont récemment montré que l'existence de ces clusters pouvait également avoir une fonction biologique. Une des tiges boucles joue un rôle d'aide « helper » ou auxiliaire. Les boucles permettent la maturation de tiges boucles n'ayant pas les caractéristiques structurales optimales pour arriver à maturation. C'est ainsi que le miR-451 est produit, mais c'est également le cas pour d'autres miARN. L'étude relève, en outre, que des tiges boucles possédant des structures non optimales sont enrichies dans des clusters de miARN. Ceci est rendu possible notamment par le recrutement de facteurs protéiques assistant le complexe de maturation des miARN (Figure 6) (Fang & Bartel, 2020 ; Shang et al., 2020).

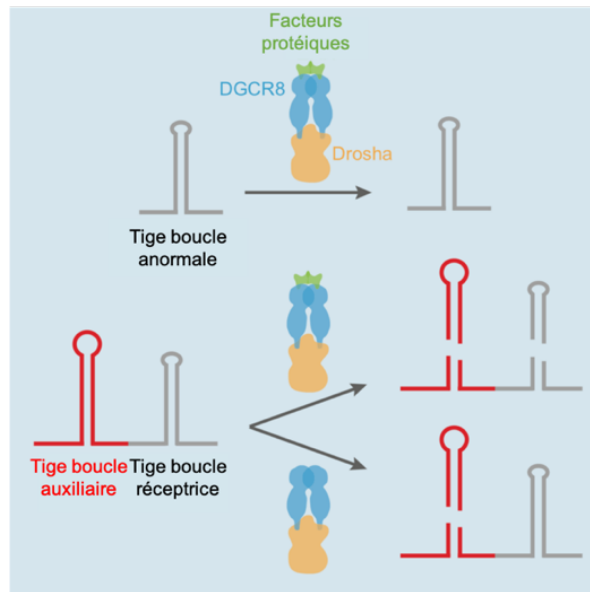


Figure 6 : Une tige boucle peut aider une autre boucle atypique lorsqu'elle se trouve à proximité (d'après Fang & Bartel, 2020)

4.2 Transcription des miARN

Transcrits par l'ARN polymérase II, les pri-miARN contiennent, pour bon nombre d'entre eux, une coiffe en 5' ainsi qu'une queue poly A en 3'. Ce sont les caractéristiques des gènes de classe de type II (Lee et al., 2004). La queue poly A est moins systématique, car la production du miARN survient parfois de façon co-transcriptionnelle qui ne permet pas une maturation normale en 3' (Ballarino et al., 2009). Comme décrit dans le paragraphe précédent, les miARN sont classés en deux catégories, les miARN intergéniques et les intragéniques.

Les miARN intergéniques possèdent leur propre unité de transcription et sont donc transcrits de manière autonome et indépendante. Ils ont souvent un niveau d'expression supérieur à ceux co-transcrits parallèlement aux ARNm (Bartel, 2018). Les promoteurs qui contrôlent l'expression de ces miARN sont très semblables à ceux qui régulent les gènes codant les protéines. On retrouve la présence d'ilots CpG, de motifs comme la boîte TATA ou de marques particulières d'histones. Ils sont donc sous la régulation de facteurs de transcription, répresseurs ou activateurs. Ces facteurs peuvent être spécifiques d'un tissu ou d'une phase du développement (Krol et al., 2010).

Les miARN intragéniques, quant à eux, sont décrits comme appartenant à la même unité de transcription que celle de leur gène hôte. Ils sont d'ailleurs orientés

souvent dans le même sens et semblent soumis aux mêmes régulations. Ces hypothèses sont confirmées par une forte corrélation entre l'expression du miARN et du transcrit du gène hôte (Baskerville & Bartel, 2005). Cependant, des études ont montré que certains de ces miARN intragéniques possèdent un promoteur interne à l'instar des miARN intergéniques, et sont donc transcrits de façon autonome et indépendante du gène hôte. Ils sont sous le contrôle de la polymérase de type II. Une double transcription semble possible (Ozsolak et al., 2008).

À ce jour, bien que décrite de manière de plus en plus précise, l'exacte organisation génomique des miARN et la position de leur promoteur n'est pas complètement élucidée. Par exemple, certaines études montrent que la transcription de certains miARN se fait par l'ARN polymérase III. Mais ces miARN semblent très minoritaires (Borchert et al., 2006 ; Fang & Bartel, 2020).

4.3 Boucle de rétrocontrôle de la transcription des miARN

La transcription de certains miARN peut aussi être régulée par des boucles de rétrocontrôle. Ce paragraphe vient illustrer ce constat par différents exemples de boucles de régulation.

Premièrement, un facteur de transcription (A) peut être la cible d'un miARN (B) dont il réprime la transcription. Ainsi, les deux acteurs de ce réseau se régulent négativement (Figure 7 A). Ce mode de régulation est souvent impliqué dans le développement, et notamment dans celui des granulocytes par le miR-223 et le facteur nuclear factor I-A (NFI-A) (Figure 7B).

Dans les précurseurs indifférenciés myéloïdes, NFI-A réprime la transcription du précurseur du miR-223 en se fixant sur son promoteur. Le niveau d'expression du miR-223 est maintenu bas. Lors de la différenciation en granulocytes, induite par l'acide rétinoïque, le facteur C/EBP remplace NF1-A pour activer la transcription du miR-223. Ce miR-223 a pour cible le facteur NF1-A, ce qui réprime son activité et participe d'autant plus à l'accumulation du miARN. Cette boucle de rétrocontrôle assure le bon développement des granulocytes et les empêche de revenir à un état indifférencié, comme le montre la Figure 7 C (Ebert & Sharp, 2012 ; Fazi et al., 2005).

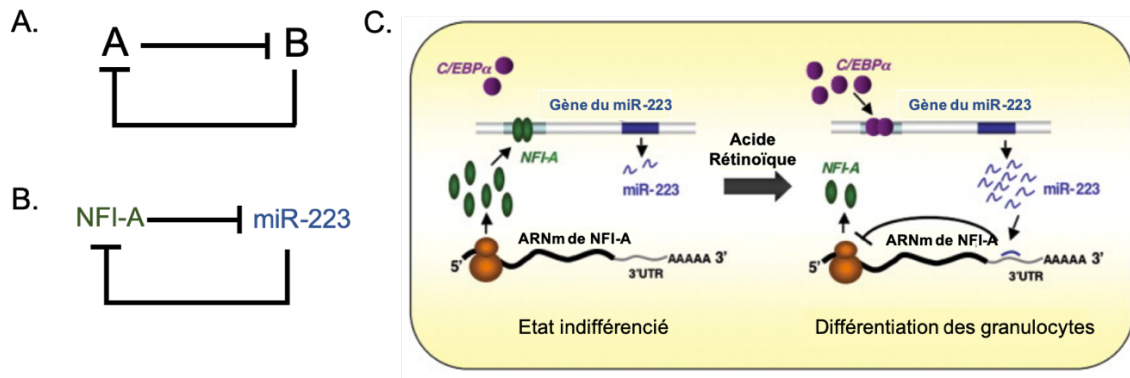


Figure 7 : Boucle de régulation négative entre un miARN et un facteur de transcription. A et B : représentations schématiques de la boucle de régulation, C : représentation schématique décrivant l'effet de la boucle de régulation entre le miR-223 et le facteur NFI-A (d'après Ebert & Sharp, 2012 ; Fazi et al., 2005), détails dans le texte.

À l'inverse, il existe des boucles de rétrocontrôle positives où un composant A active un composant B, et réciproquement (Figure 8 A). Chez le vers *C. elegans*, LIN12 active la transcription du miR-61. miR-61 réprime l'expression de vav-1 qui est un régulateur négatif de LIN12. De ce fait, miR-61 active indirectement sa propre transcription (Figure 8 A et B).

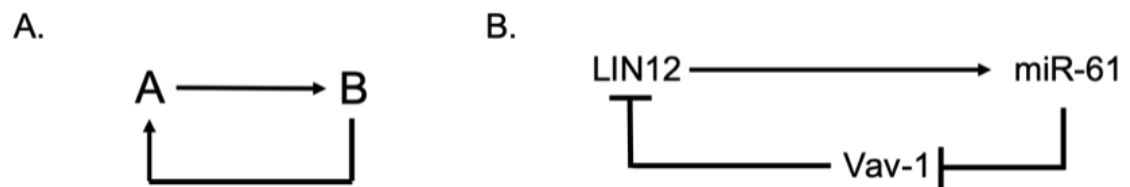


Figure 8 : Boucle de régulation positive qui active sa propre transcription (d'après Ebert & Sharp, 2012)

Pour finir, les boucles de rétrocontrôle peuvent être plus complexes. Un composant A peut activer la transcription d'un miARN (B). Le composant B inhibe un composant C qui, lui-même, inhibe le composant A. Le composant C peut également inhiber la transcription du miARN B, ce qui conduit à une boucle de contrôle positive (Figure 9 A). Par exemple, dans le processus de granulopoïèse, CCAAT enhancer-binding protein alfa (C/EBPα) active la transcription du miR-223 qui a pour cible le facteur de transcription E2F1. Cette protéine, E2F1, réprime également le facteur C/EBPα. Lorsque C/EBPα est réprimé par des facteurs protéiques, notamment dans

le cadre d'une leucémie myéloïde aiguë, le facteur E2F1 peut inhiber la transcription du miR-223 (Ebert & Sharp, 2012 ; Pulikkan et al., 2010).

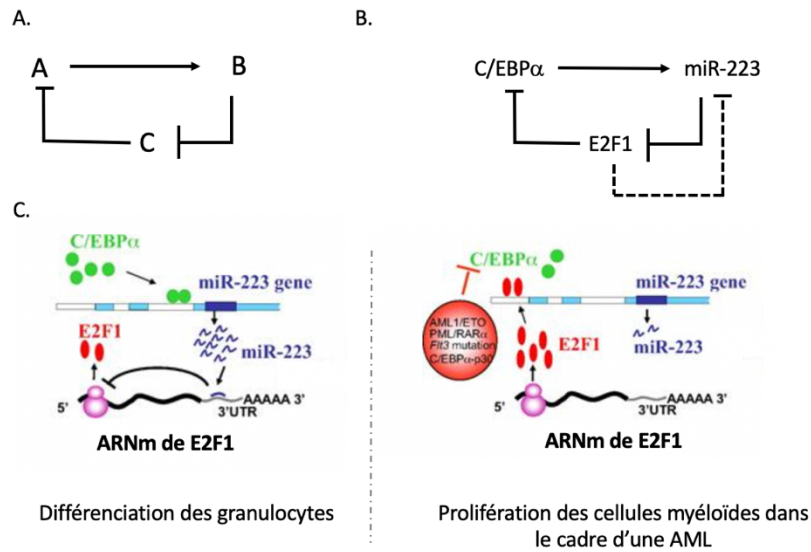


Figure 9 : Boucle de régulation impliquée dans la leucémie myéloïde aiguë ; AML : Leucémie myéloïde aiguë (d'après Ebert & Sharp, 2012 ; Fazi et al., 2005), détails dans le texte.

Ces exemples montrent que la transcription, et donc la quantité, de miARN dans la cellule est soumise à de nombreuses régulations pour maintenir leur homéostasie. De plus, les miARN sont intégrés à des réseaux de gènes pour assurer le développement harmonieux de la cellule. Les réseaux de miARN seront développés dans le paragraphe 12.

5 Biogenèse des miARN

La biogenèse des miARN comporte trois grandes étapes : la transcription de l'ADN en miARN primaires (pri-miARN), le clivage du pri-miR en miR précurseurs (pré-miARN) dans le noyau et le clivage du pré-miR en miARN dans le cytoplasme.

La transcription conduit à la formation d'une structure appelée pri-miARN. Cette structure a la particularité de pouvoir s'auto-hybrider, par complémentarité de séquence, pour former une structure tige-boucle. Des mésappariements sont souvent retrouvés dans la partie double brin. La tige-boucle va ensuite être clivée successivement pour conduire à la formation du pré-miARN, puis du pri-miARN et enfin du miARN dit mature. Les protéines Drosha et DICER, possèdent une activité

RNAse III. Accompagnés de leur(s) partenaire(s), ils constituent les éléments centraux de ce processus, car ils sont responsables des coupures qui permettent d'aboutir au miARN mature. La précision du site de clivage permet d'assurer l'intégrité de la séquence du mi-ARN mature, qui ciblera des ARN par complémentarité de séquences (**Figure 10**) (Bartel, 2018).

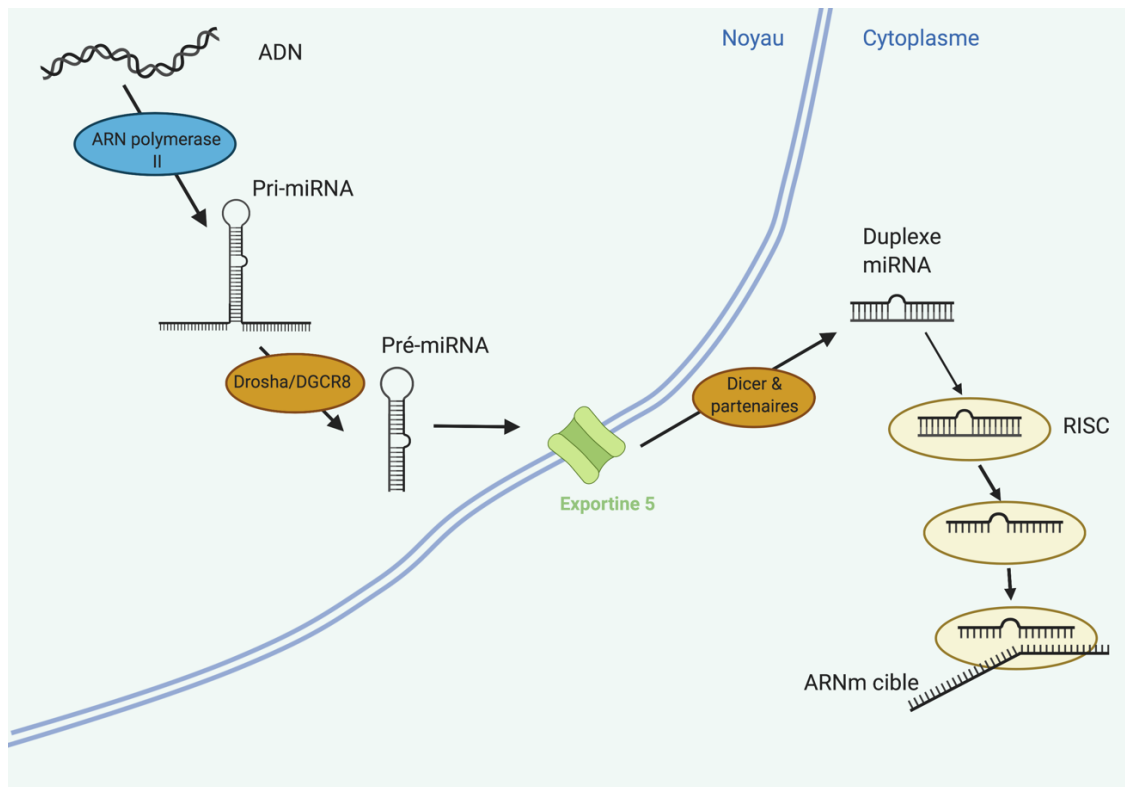


Figure 10 : Biogénèse des miARN. La transcription par l'ARN polymérase II conduit à la formation d'un pri-miARN qui va être clivé par Drosha et son partenaire DGCR8 pour former le pré-miARN. Ces premières étapes ont lieu dans le noyau. Le pré-miARN est ensuite exporté dans le cytoplasme par l'Exp5. Dicer et ses partenaires clivent une seconde fois pour former un miARN en duplex qui va être pris en charge par le RISC pour dégrader ses cibles (adaptée de Daugaard & Hansen, 2017).

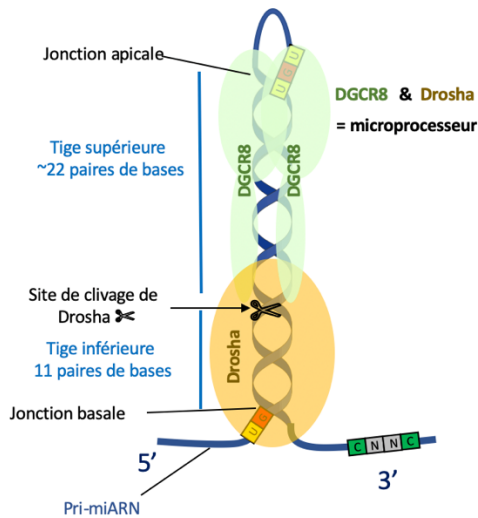
5.1 Clivage du pri-miARN

Dans un premier temps, le pri-miARN est pris en charge dans le noyau par un complexe hétérotrimérique appelé « microprocesseur » (Lee et al., 2002 ; Lee et al., 2004). Le microprocesseur, complexe d'environ 364 kDa, est composé d'une molécule de la protéine endonucléase Drosha et de deux molécules de son partenaire DGCR8, aussi appelé Pasha chez la drosophile et le nématode (Denli et al., 2004). Drosha fait

partie de la famille des endonucléases de type III. Celles-ci ont la particularité de cliver les ARN double brin. Plus précisément, Drosha est une RNase III de classe II, dont la caractéristique est de posséder deux domaines RNase III et un domaine de liaison à l'ARN double brin (MacRae & Doudna, 2007). Cette RNase reconnaît la jonction basale de la structure tige boucle du pri-miARN. La séquence entre les parties simple brin et double brin est caractérisée par la présence du dinucléotide « UG ». Drosha clive ainsi à une distance de 11 nucléotides du site de reconnaissance. Sa capacité à toujours couper à une distance fixe lui a valu d'être qualifié de « règle ». Son partenaire, DGCR8, possède deux domaines de liaison à l'ARN double brin et participe à la reconnaissance de la structure du pri-miARN, notamment grâce au motif « UGU » présent au niveau de la jonction apicale. Ce modèle proposé par Nguyen et ses collaborateurs en 2015, contredit ce qui avait précédemment été proposé en 2006 par Han et son équipe qui suggéraient que DGCR8 interagissait avec les deux jonctions. Le bon positionnement du microprocesseur est crucial pour que la coupure se fasse du bon côté (Han et al., 2006 ; Nguyen et al., 2015).

En 2015, Fang et ses collaborateurs complètent ce modèle en ajoutant des caractéristiques retrouvées sur un grand nombre de tiges boucles. Premièrement, la longueur de la région d'appariement optimale est de 35 ± 1 nucléotides. Ces chercheurs décrivent le microprocesseur comme étant une structure rigide, ayant fonction de pied à coulisse, qui tolère peu de changements dans la longueur de la tige boucle. Ce pri-miARN comporte des appariements de types *wooble* ou des mésappariements. Un motif est identifié comme récurrent. Il s'agit du mésappariement GHG (le H représente n'importe quel nucléotide sauf « G ») dans la région du futur duplex, qui favorise la maturation des tiges boucles (Fang & Bartel, 2015) (Figure 11).

A. Modèle proposé par Nguyen et al, 2015 :



B. Modèle proposé par Fang et al, 2015 :

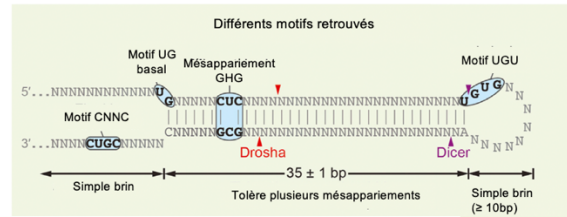


Figure 11 : Reconnaissance de la tige boucle par le microprocesseur. A. Modèle de la reconnaissance du pri-miARN par le microprocesseur proposé par Nguyen et ses collaborateurs en 2015. Le microprocesseur, complexe hétérotrimérique composé d'une molécule de Drosha et de deux molécules de DGCR8. Le site de coupure de Drosha délimite une tige supérieure d'environ 22 nucléotides et une tige inférieure d'environ 11 nucléotides. Des motifs « UG » à la jonction basale, UGU à la jonction apicale et « CNNC » en 3' du pri-miARN participent à l'orientation et à la reconnaissance de la structure par le complexe. (Adaptée de Nguyen et al, 2015 B.) Modèle proposé par Fang et collaborateurs qui précise les différents motifs retrouvés sur le pri-miARN et qui aide le bon positionnement du microprocesseur (Fang & Bartel, 2015).

Un motif « UGU » est fréquemment retrouvé au niveau de la jonction apicale, mais ce n'est pas systématique. Si la jonction apicale est suffisamment caractéristique, c'est-à-dire composée d'une structure basale optimale, avec de longs simples brins, et de la présence du motif GU, il peut ne pas être présent sans pour autant empêcher la biogenèse du pré-miARN. C'est le cas pour le pri-miR-16-1 (Fang & Bartel, 2015 ; Nguyen et al., 2015). De plus, une étude montre que la Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) intervient dans la maturation des pri-miARN qui ne possèdent pas le motif « UGU » (Church et al., 2017). Sans que cela soit systématique, un motif CNNC (N pour n'importe quel nucléotide) est retrouvé très conservé entre les positions 16 et 18 en aval du site de clivage de Drosha. Bien qu'il ne soit pas indispensable, ce motif semble participer aussi à la reconnaissance des pri-miARN. Ainsi coupé, le pri-miARN devient le pré-miARN, une tige boucle d'environ 22 nucléotides avec deux extrémités débordantes en 5' et en 3' (Han et al., 2006 ; Nguyen et al., 2015). Ces motifs sont

indispensables lorsque la taille de la tige boucle n'est pas optimale (Denzler & Stoffel, 2015).

Grâce à tous ces motifs, le microprocesseur est le garant de la sélection des tiges boucles qui donneront les futurs miARN. En effet, parmi les milliers de tiges boucles présentes dans la cellule, seules quelques centaines sont des précurseurs des miARN et seront sélectionnées par le microprocesseur. Cela permet de garantir l'intégrité du pool des miARN (Bartel, 2018 ; Fang & Bartel, 2015) (Figure 11 A et B).

5.2 Régulation du microprocesseur

Le microprocesseur a un rôle essentiel dans la production de miARN. De ce fait, son activité doit être régulée pour maintenir une « certaine quantité de miARN » dans la cellule.

DGCR8, composant majeur du microprocesseur, participe à sa stabilité. En effet, il favorise la stabilité de son partenaire Drosha. Ainsi, il exerce une régulation positive sur le microprocesseur (Nguyen et al., 2015). À l'inverse, le microprocesseur exerce une régulation négative de DGCR8 en clivant une structure tige boucle présente sur l'ARNm de DGCR8 (Han et al., 2009).

Il existe également des facteurs extérieurs responsables d'une régulation négative. Par exemple, nous pouvons citer les facteurs nucléaires 90 (NF90) et les facteurs nucléaires 45 (NF45), agissant en hétérodimères qui peuvent lier les pri-miARN. Cette liaison perturbe l'association entre le pri-miARN et le microprocesseur, et donc la maturation des pri-miARN. Drosha est aussi sensible au stress cellulaire. Sous l'influence du stress, la kinase Mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 va phosphoryler Drosha ; ce qui réduit son interaction avec DGCR8 et, ainsi, inhibe Drosha (Q. Yang et al., 2015). L'affinité entre ce complexe et tous les pri-miARN n'est pas équivalente. L'étude de Sakamoto et ses collaborateurs montre une liaison plus importante à pri-let-7a-1 qu'à pri-miR-21, par exemple (Sakamoto et al., 2009).

Des modifications du pri-miARN peuvent également être à l'origine de ce contrôle négatif. En effet, les désaminases ADAR, qui ont été décrites précédemment, ciblent certains pri-miARN. Selon la position, cette modification inhibe le clivage par Drosha. Par exemple, l'édition du pri-miR142 est décrite comme empêchant sa prise en

charge par Drosha. Ainsi édité, le précurseur du miARN semble être dégradé, notamment par des ribonucléases qui reconnaissent spécifiquement cette modification sur les ARN doubles brins (W. Yang et al., 2006). Environ 16 % des pri-miARN sont soumis à une édition A → I, et principalement sur des triplets « UAG ». Bien que l'édition ait majoritairement comme conséquence de diminuer la formation du pré-miARN par Drosha, l'expression du miR-203 est augmentée par ce type d'édition.

Il existe de la même façon de nombreux facteurs extérieurs qui favorisent la production de pré-miARN. À titre d'exemple, la protéine KH-type splicing regulatory protein (KSRP) favorise l'activité de Drosha pour certains pri-miARN possédant des régions riches en nucléotides « G » (Trabucchi et al., 2009).

5.3 Exportation nucléaire

Le pré-miARN formé est une tige boucle d'environ 70 nucléotides avec deux nucléotides sortants à son extrémité 3' (Y. Lee et al., 2003). Initialement généré dans le noyau, il est ensuite transloqué dans le cytoplasme majoritairement *via* l'Exportine5 (Exp5). Il s'agit d'un transport actif dépendant du guanosine triphosphate (GTP). L'Exp5 se lie à la protéine RanGTP et reconnaît les deux nucléotides qui dépassent en 3'. Le triplex ainsi formé de l'Exp5, du pré-miARN et de la molécule de RanGTP est transloqué du noyau vers le cytoplasme par un pore nucléaire. Cette structure assure une protection contre les nucléases. Une fois dans le cytoplasme, la molécule de RanGTP est hydrolysée en RanGDP, entraînant ainsi la libération du pré-miARN (Wang et al., 2011 ; Yi et al., 2003).

5.4 Clivage du pré-miARN

Les deux brins de la tige boucle formant le pré-miARN sont clivés par Dicer associée à ses partenaires transactivation response element RNA-binding protein (TRBP) et/ ou PACT (Wilson et al., 2015). Dicer est, comme Drosha, une RNase III. Elle est composée, entre autres, de deux domaines RNase III, d'un domaine de liaison à l'ARN double brin, mais aussi d'un domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) et d'un domaine hélicase (MacRae & Doudna, 2007). Cette enzyme reconnaît l'extrémité située

à l'opposé de la boucle grâce à ses deux poches : la poche 3' et la poche 5'. Dans la poche 3', se positionne l'extrémité 3' avec ses deux nucléotides flanquants et la poche 5' reconnaît le phosphate de l'extrémité 5'. La coupure se fait 22 nucléotides après l'extrémité 5'P, en laissant une autre extrémité 3' avec deux nucléotides débordants. Ainsi, le duplex mi-ARN possède deux nucléotides débordants à chaque extrémité 3' (Lee et al., 2002 ; Park et al., 2011 ; Zhang et al., 2004). L'équipe de Shuo Gu a établi des règles supplémentaires qui déterminent l'activité de Dicer. Elle propose un modèle où le site précis de clivage par Dicer serait le résultat de plusieurs étapes. En premier lieu, Dicer se positionne en reconnaissant les extrémités basales. Ensuite, un second contact entre Dicer et l'ARN se fait au niveau apical. Pour finir, l'efficacité de clivage est optimale lorsqu'une distance de 2 nucléotides sépare le site de clivage (déterminé par la région catalytique de Dicer) et la boucle (Figure 12) (Gu et al., 2012).

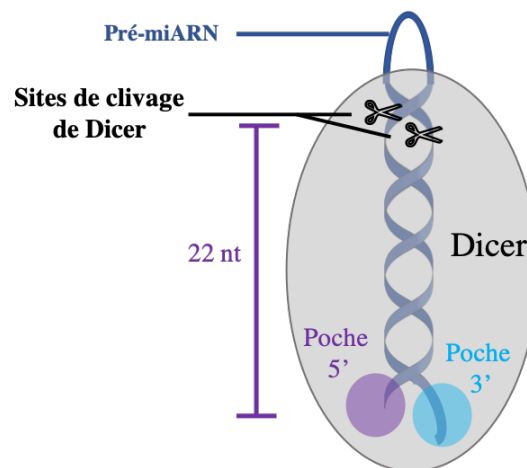


Figure 12 : Modèle de l'activité de Dicer. Dicer reconnaît les deux extrémités du pré-miARN par deux poches, une en 3' et une en 5'. Le site de clivage de Dicer se situe environ à 22 nucléotides à l'extrémité opposée (adaptée de Park et al., 2015).

5.5 Formation du miARN mature

5.5.1 Sélection du brin guide

Dans sa forme double brin, le miARN n'est pas actif. Le duplex, comme précédemment décrit est composé d'un brin dit « Guide » qui est le futur miARN et

d'un brin dit « Passager ou * : dit étoile » qui sera dégradé. Son élimination est dépendante de la formation d'un complexe ribo-nucléo-protéique appelé le RNA-Induced-Silencing Complex (RISC). La sélection du brin guide est une étape cruciale. En effet, la spécificité de la cible du mi-ARN est dépendante de la séquence de ce brin. Cette sélection est principalement dépendante de la stabilité des 2 brins, influencée par des paramètres thermodynamiques dont l'énergie de liaison des 4 derniers nucléotides (deux derniers appariés et les deux derniers libres). Un mésappariement interne change également ces paramètres de sélection (Noland & Doudna, 2013). Le brin dont l'extrémité 5' a la plus faible énergie de liaison est le plus souvent le futur miARN. La grande majorité des miARN humains ont un U en 5' du brin guide et un C en 5' du brin passager. Ceci est expliqué par la préférence du nucléotide U ou A par la poche 5' (Frank et al., 2010). Le brin sens est aussi plus souvent composé d'un excès de nucléotide purique (A ou G) que de base pyrimidique (C ou U). Des modifications post-transcriptionnelles peuvent elles aussi avoir un impact sur la sélection des brins. Dicer, TRBP, ainsi que PACT, lorsqu'ils sont liés à Ago, influencent la dynamique d'assemblage de ce complexe, d'où leur rôle important à cette étape. Il n'est pas rare que les deux brins d'un même duplex soient détectés dans la cellule, leur expression peut être équivalente ou nettement déséquilibrée au profit de l'un des brins (Figure 13) (Meijer et al., 2014).

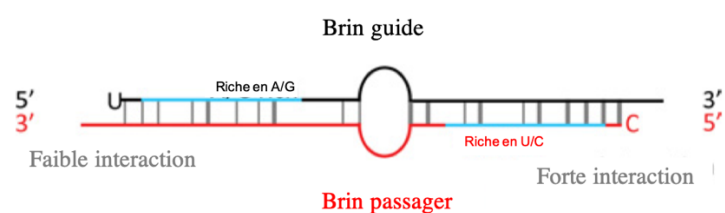


Figure 13 : Caractéristiques des brins conduisant à la sélection du brin guide et du brin passager (adaptée de Meijer et al., 2014)

5.5.2 Assemblage du complexe RISC

L'assemblage du RISC a lieu en deux étapes successives. Premièrement, le miARN composé des deux brins (guide et passager) vient s'assembler avec la protéine Ago ; le complexe est alors appelé le pré-RISC. Les protéines chaperonnes Hsc70/Hsp90

participent au changement de conformation d'Ago pour permettre le chargement (« loading ») du duplex, de façon ATP dépendante (Iwasaki et al., 2010). Puis, dans un second temps, les deux brins sont séparés, le brin passager est dégradé pour former le RISC mature (Kawamata & Tomari, 2010). Un mésappariement dans le duplex favorise la séparation des deux brins.

Le composant essentiel pour l'activité de ce complexe est un membre de la famille des protéines Argonautes (Ago). Chez les mammifères, il existe quatre isoformes d'Ago : Ago1 à Ago4. Initialement, seule Ago2 a été décrite comme ayant une activité enzymatique entraînant le clivage de l'ARN (Liu et al., 2004). Une étude plus récente montre qu'Ago3 possède, elle aussi, une telle activité, mais pas avec tous les miARN (Park et al., 2017). Les protéines Ago sont des protéines multi-domaines. Elles sont constituées d'un domaine N-terminal, d'un domaine PAZ, d'un domaine MID (pour *middle*, qui se situe au centre de la protéine) et d'un domaine Piwi. Ce dernier est responsable de l'activité endonucléase d'Ago, alors que le domaine PAZ est impliqué dans la reconnaissance des extrémités 3' des duplex miARN (Jinek & Doudna, 2009).

6 Voies alternatives de biogénèse des miARN

La voie canonique de biogénèse des miARN, telle qu'elle est décrite dans le paragraphe précédent, est maintenant bien caractérisée. Cependant, il existe des voies alternatives qui permettent la production de miARN en contournant la voie canonique. Ces mécanismes sont mis en évidence, notamment, dans des études comme celle de Kim et collaborateurs. Afin de préciser le rôle de chaque acteur, une lignée cellulaire humaine a été modifiée par *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR-Cas9) pour être déficiente pour Drosha, Dicer ou Exportine5 (Exp5). L'analyse transcriptomique de ces lignées révèle que la production des miARN est très fortement dépendante de Drosha. La très grande majorité des miARN n'est presque plus exprimée (extinction d'au moins 90 %) dans les cellules déficientes pour Drosha ou pour Dicer (96,5 % et 96 % respectivement). La production de miARN est moins dépendante de l'Exp5. Une diminution d'expression supérieure à 50 % n'est observée

que pour 75 % des miARN (Kim et al., 2016). Plusieurs voies alternatives de biogénèse ont été identifiées. Ces voies sont indépendantes de l'un ou plusieurs des acteurs de la voie canonique. Cela explique la présence de miARN malgré la déficience observée de Drosha, Dicer ou de l'Exp5. On parle de voies de production des miARN non canoniques, et donc de gènes de miARN et miARN non canoniques (Daugaard & Hansen, 2017).

6.1 miARN dont la biogénèse est indépendante de Dicer

De nombreux exemples ont montré que des miARN pouvaient être générés sans l'implication de Drosha/DGCR8, mais de manière Dicer dépendante. Il existe au moins un exemple qui montre que l'inverse est également possible. Il s'agit du miR-451, qui fait partie des miARN les plus exprimés dans les érythrocytes des vertébrés. Suite à la coupure par Drosha, la tige boucle du pré-miARN-451 est trop courte pour être prise en charge par Dicer. La fin de la maturation est dépendante de la protéine Ago2 et de ses partenaires qui composent le RISC. Ago2 clive, grâce son activité clivante dite « *slicer* » en anglais, pour former un intermédiaire d'une trentaine de nucléotides qui sera ensuite mûré par une ribonucléase spécifique Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) pour devenir le miR-451 actif (Cheloufi et al., 2010 ; Yang et al., 2010 ; Yoda et al., 2013). Ce mécanisme est également retrouvé chez le poisson-zèbre, preuve de sa conservation entre différentes espèces (Cifuentes et al., 2010).

6.2 Les mirtrons

L'exemple de miARN non canoniques le plus décrit est certainement celui des mirtrons. Ces derniers représentent une classe de miARN qui sont générés en contournant le clivage nucléaire par l'endonucléase Drosha. Ces miARN correspondent à un produit issu de la machinerie d'épissage. Plus précisément, les gènes codant ces miARN se situent dans des introns et ont la capacité à former, par complémentarité de séquences, une tige boucle rapprochant les sites 3' et 5' d'épissage. Cependant, les pré-miARN ainsi formés sont dépendants de l'Exp5 pour leur export vers le cytoplasme où ils sont clivés par Dicer. Les deux voies diffèrent donc sur la première étape

correspondant au clivage dans le noyau, mais se rejoignent ensuite pour un même processus de maturation. Les mirtrons ont été identifiés aussi bien chez la drosophile et le nématode (Okamura et al., 2007 ; Ruby et al., 2007) que chez les mammifères (Wen et al., 2015). Cependant, il existe plusieurs catégories de mirtrons. En effet, il se peut qu'ils aient des extrémités 3' ou 5' débordantes, définissant ainsi trois classes de mitrons (sans extrémité débordante, avec une extrémité débordante 3' et l'autre débordante en 5') (Wen et al., 2015). Les mitrons ne possédant pas d'extrémité peuvent être directement transférés dans le cytoplasme. À l'inverse, les mitrons possédant une « queue » 3' ou 5' nécessitent l'activité de 3' ou 5' exonucléase (Flynt et al., 2010 ; Ladewig et al., 2012)

6.3 miARN dérivés des ARN de transfert

Les ARNt peuvent également conduire à la formation de miARN non canoniques. En effet, de nombreux fragments issus d'ARNt ont été retrouvés comme partenaires d'Ago dans des cellules humaines. Il s'agit de fragments d'ARNt matures provenant de l'extrémité 3' ou 5' qui sont transférés dans le cytoplasme. L'extrémité 3' du précurseur de l'ARNt peut également conduire à la formation de miARN matures. L'implication de Dicer dans la biogénèse de ces fragments ne semble cependant pas systématique (Cole et al., 2009 ; Kuscu et al., 2018). Une autre enzyme, la RNases Z peut participer à leur maturation ; elle prend en charge plutôt ceux dont l'extrémité 5' donnera un miARN (Lee et al., 2009).

La protéine Lupus autoantigène (LA) est un inhibiteur de la voie de production des miARN à partir des ARNt, dépendante de Dicer. Lorsqu'elle se lie aux ARNt, elle empêche la dégradation par les exonucléases et maintient la conformation de l'ARNt. Cette protéine inhibe l'activité de Dicer sur les ARNt. Il y a cependant un exemple qui échappe à cette régulation : le pré-ARNt-Ile présente une faible affinité pour LA. En sa présence, il peut adopter une conformation qui lui permet d'être transféré dans le cytoplasme par l'Exp5. Puis Dicer peut le cliver pour former le miR-1983 (Hasler et al., 2016). Ainsi formées, ces structures peuvent s'associer à Ago et entraîner une dégradation d'ARN cibles, à l'instar des miARN (Haussecker et al., 2010 ; Kumar et al., 2014).

6.4 miARN dérivés de snoARN

Une étude montre également qu'un snoARN (ACA45) peut être maturé en miARN. Les snoARN sont des petits ARN nucléaires régulateurs de la maturation de certains ARN non codants. Cette maturation implique Dicer sans Drosha. Les miARN sont issus de la transcription du gène du snoRNA suivi d'un épissage par la Lariat debranching enzyme 1 (DBR1). Cette forme de pré-miARN est ensuite prise en charge par Dicer, à l'instar des miARN canoniques. Les miARN dérivés des snoARN font approximativement 21-22 nucléotides, comme les miARN canoniques, et peuvent lier les protéines Ago ; ce qui conduit à la répression de ses cibles comme un miARN canonique (Ender et al., 2008).

6.5 Les agotrons

Découverts plus récemment, les agotrons représentent une nouvelle classe de miARN non canoniques. Leur biogénèse est indépendante de la voie classique. Leur nom vient de leur association à la protéine Ago, qui participe entre autres à leur stabilité (Hansen et al., 2016).





Les agotrons, à l'instar des mirtrons, sont transcrits à partir d'un intron, plutôt de petite taille (<150 nucléotides). Ils sont ensuite exportés dans le cytoplasme, probablement par l'Exp5. Puis, d'une longueur de 100 nucléotides, ils sont pris en charge par Ago sans avoir été maturés par Dicer. Bien qu'ayant une biogénèse différente, encore peu décrite, ces agotrons sont des régulateurs fonctionnels au même titre que les miARN classiques. Deux agotrons (matures) sont cependant bien décrits : ils sont issus des gènes hôtes *PKD1* et *MAST1*. Actuellement, leur genèse n'est pas bien connue. Les agotrons sont conservés chez les mammifères, dont la souris (Daugaard & Hansen, 2017 ; Hansen et al., 2016).

6.6 Endo-siARN et endo-shARN

Les endo-short-interfering ARN (endo-siARN) sont des molécules d'ARN double brin (Piatek & Werner, 2014). Leur maturation est indépendante de Drosha/DGCR8, mais pas de Dicer qui clive la tige double brin. Ils sont ensuite incorporés dans la protéine Ago2 et sont responsables de régulations post-transcriptionnelles. Ils ont été décrits chez la plante, chez la drosophile et chez *C. elegans*. Leur existence est encore débattue chez les mammifères.

Les endo-short-hairpin (endo-shARN) sont produits par une transcription qui conduit à une structure tige boucle coiffée d'une 7-méthyl guanosine. Le site d'initiation de la transcription définit l'extrémité 5' d'une structure substrat de Dicer. Avant d'être clivés par Dicer, les endo-shARN sont exportés dans le cytoplasme. Comme les endo-siARN, ils ont été décrits dans les ovocytes murins (Daugaard & Hansen, 2017).

Tableau 2 Récapitulatif des différents miARN non canoniques en fonction de leur dépendance aux enzymes Drosha et Dicer pour leur biogénèse. miARN : microARN, snoARN : small nucleolar ARN, endo-shARN : endo-short-hairpin ; endo-siARN : endo-short-interfering ARN

	Drosha	 Dépendant	 Indépendant
Dicer			
 Dépendant		<ul style="list-style-type: none"> • miARN canoniques 	<ul style="list-style-type: none"> • snoARN • ARNt • Endo-siARN • Endo-shARN
 Indépendant		<ul style="list-style-type: none"> • miR-451 	<ul style="list-style-type: none"> • Agotron • ARNt

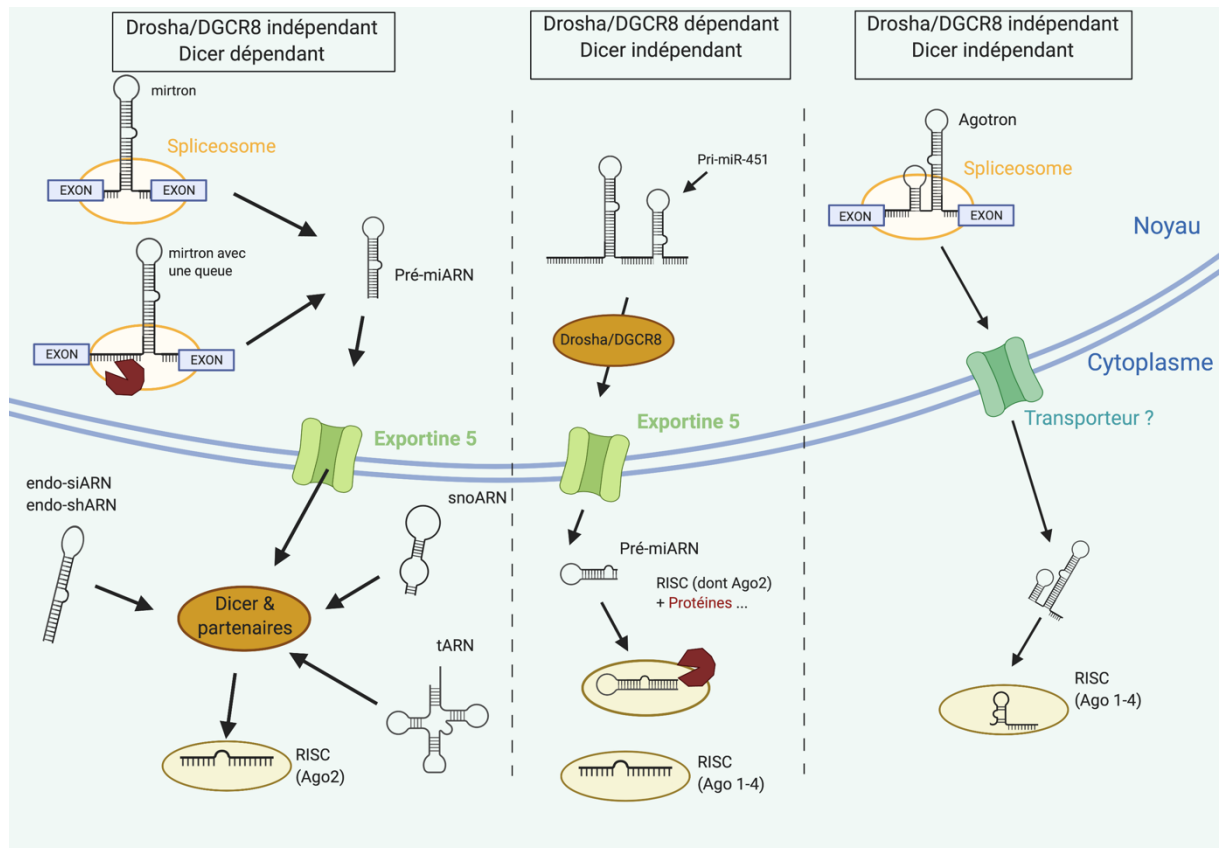


Figure 14 : Les différentes voies de biogénèse des miARN non canoniques. Les mirtrons, endo-siARN, endo-shARN, snoARN et tARN sont issus d'une voie Drosha/DGCR8 indépendante mais Dicer dépendante. Le miR-451 est issu d'une voie Drosha/DGCR8 dépendante mais Dicer indépendante et les Agotrons sont issus d'une voie Drosha/DGCR8 et Dicer indépendante. (Adaptée de Daugaard & Hansen 2017).

7 Stress cellulaire et régulation de la biogénèse des miARN

Une dérégulation de la biogénèse des miARN peut modifier considérablement la quantité de miARN disponible dans la cellule. Cette perturbation est objectivée par une accumulation des pré- ou pri-miARN au détriment des miARN matures lorsque la voie de production est inhibée. À l'inverse, une augmentation du nombre de miARN matures est observée en cas de sur-activité de la voie. Ces régulations positives ou négatives vont être illustrées par des exemples non exhaustifs dans les deux paragraphes suivants.

7.1 Augmentation de la biogénèse des miARN

Les protéines SMAD sont des activateurs de la voie du Transforming Growth Factor TGF- β / Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4). Cette voie favorise la transcription de certains miARN. La stimulation des protéines récepteurs spécifiques de SMAD entraîne la phosphorylation et la translocation dans le noyau pour s'associer à Drosha/DGCR8 et ainsi favoriser le clivage du pri- en pré-miARN (Davis et al., 2010). La voie de signalisation du TGF β peut aussi favoriser la transcription de certains gènes de miARN, entre autres le miR-216a et le miR-217, en se fixant sur le promoteur du gène codant miR-216 (Kato et al., 2009).

La protéine P53, plus connue pour son rôle de facteur de transcription, peut aussi être impliquée dans la régulation de l'expression de certains miARN (par exemple, miR-34 et miR-145). Une stimulation par la doxorubicine (agent entraînant des dommages à l'ADN) provoque une augmentation de la quantité de certains miARN matures. Ce phénomène est dû à une régulation positive du microprocesseur par Drosha (Navarro & Lieberman, 2015 ; Sachdeva et al., 2009 ; Suzuki et al., 2009).

7.2 Inhibition de la voie de biogénèse des miARN

La protéine P53 décrite dans le paragraphe précédent comme stimulant la production de certains miARN peut aussi, lorsqu'elle est stimulée par les dommages à l'ADN, diminuer la biogénèse d'autres miARN (le cluster de miR-17-92 et miR-221/222) (Suzuki et al., 2009). Lorsqu'Ago2 est phosphorylée et hydroxylée, l'interaction entre Dicer et Ago2 est réduite. L'hypoxie peut aussi réguler négativement l'activité de Drosha, Dicer et Ago2 (Rupaimoole et al., 2014 ; Shen et al., 2013). Le paragraphe précédent décrit la voie *Transforming Growth Factor-beta* (TGF β) comme activant la transcription des miARN ; cette voie peut aussi inhiber la transcription de certains miARN, comme le miR-29 (Qin et al., 2011).

De nombreux autres exemples présentés dans la revue d'Olejniczak et ses collaborateurs peuvent illustrer la fine régulation dont la biogénèse des miARN fait l'objet, et l'impact éventuel du stress sur l'expression des miARN matures (Olejniczak et al., 2018).

8 Dynamique du métabolisme des miARN

La quantité de miARN présente dans la cellule est le résultat d'une somme d'effets. Elle dépend de la biogénèse des miARN qui vient d'être détaillée, de leur stabilité, ainsi que de leur dégradation. Les deux paragraphes suivants détailleront la stabilité des miARN et leur dégradation, ce qui définit leur demi-vie.

8.1 Stabilité des miARN

La majorité des miARN sont extrêmement stables. En effet, 24 heures après l'inhibition de la transcription, la quantité totale de miARN demeure inchangée (ou presque) dans plusieurs lignées cellulaires, humaines ou murines et cancéreuses ou saines. Plus remarquable encore, le miR-208 dans le cœur de rat est encore présent des semaines après l'inhibition de sa transcription. À l'inverse, certains montrent une demi-vie très courte : environ 4 heures pour le miR-503. Ces différents exemples témoignent d'une différence de stabilité entre les miARN (Rissland et al., 2011 ; Guo et al., 2015). Plus récemment, l'équipe de David Bartel a confirmé ces résultats dans le modèle murin en utilisant une méthode de marquage 5-ethynyluridine (5EU). Le 5EU s'incorpore à l'ARN pendant sa biogénèse, ce qui permet de mesurer la quantité de miARN nouvellement synthétisés. La mesure des miARN est évaluée par séquençage spécifique des miARN (small-RNAseq) (Kingston & Bartel, 2019). Leur stabilité peut leur permettre d'atteindre une concentration intracellulaire élevée (pouvant être $> 1\ 000$ molécules par cellule) (Denzler et al., 2016 ; Luna et al., 2015), nécessaire pour assurer une régulation transcriptionnelle efficace sur les ARNm. Ces derniers ont des concentrations bien inférieures avec une médiane d'expression de 17 molécules par cellule. Cependant, il n'y a pas de règle générale pouvant régir la stabilité des miARN (Schwanhäusser et al., 2013 ; Schwanhäusser et al., 2011).

Il a été montré chez le nématode que l'interaction entre le miARN et Ago le protège de sa dégradation par des exonucléases 5'-3'. Cette dégradation est présentée sous le nom de Protection du miARN induite par sa cible (TNMD - *target-directed*

miARN protection). Ce phénomène est plus efficace si le RISC est associé à la cible (Chatterjee et al., 2011).

8.2 Recyclage et dégradation des miARN

Les miARN ne sont pas dégradés après la dégradation de la cible, mais seulement après plusieurs cycles de dégradation. En effet, les miARN ne sont pas dégradés après avoir entraîné la répression transcriptionnelle d'une seule cible. Ils peuvent dégrader successivement plusieurs cibles avant qu'ils ne soient eux-mêmes dégradés. On parle de recyclage des miARN dont le « *turn-over* » est important (Baccarini et al., 2011 ; Hutvagner & Zamore, 2002). Actuellement, deux mécanismes sont décrits comme étant responsables de la dégradation des miARN.

Le premier est le *Target Directed miRNA Degradation Mechanism* (TDMD). Dans ce cas, l'ARNm cible promeut la dégradation du miARN. Des modifications post-transcriptionnelles, comme l'ajout de nucléotides en 3' ou le retrait de nucléotides en 3', y sont associées et influencent la stabilité de ce dernier (Kingston & Bartel, 2019). Cette régulation n'existe pas entre tous les miARN et leurs cibles. En effet, la séquence du miARN influence ce phénomène. Il nécessite la complémentarité sur une séquence suffisamment étendue entre la région 3' UTR du miARN et sa cible, ainsi qu'un mésappariement (*mismatch*) central. Ces caractéristiques thermodynamiques sont nécessaires mais pas suffisantes. Par exemple, la présence de protéines associées ou de motifs particuliers peut influencer ce phénomène (Pawlica, et al., 2020). L'efficacité du TDMD est dépendante du ratio d'expression entre les deux (Ghini et al., 2018). Ceci suggère un phénomène de rétrocontrôle négatif (Baccarini et al., 2011). La dégradation des miARN semble faire intervenir des exonucléases ; cependant, celles-ci ne sont, pour l'instant, pas encore identifiées et le mécanisme moléculaire précis n'est pas encore décrit (Figure 15) (Pawlica et al., 2020).

L'autre mécanisme de dégradation des miARN est le Tudor-SN-mediated miRNA endonucleolytic decay, appelé TumiD. Les protéines Tudor-SN (TNS) entraînent la dégradation des protéines et des miARN chargés dans la protéine Ago2. Ce mécanisme clive préférentiellement les dinucléotide CA et UA. S'en suit une dégradation 3' vers 5' exonucléolitique (Figure 15) (Elbarbary et al., 2017).

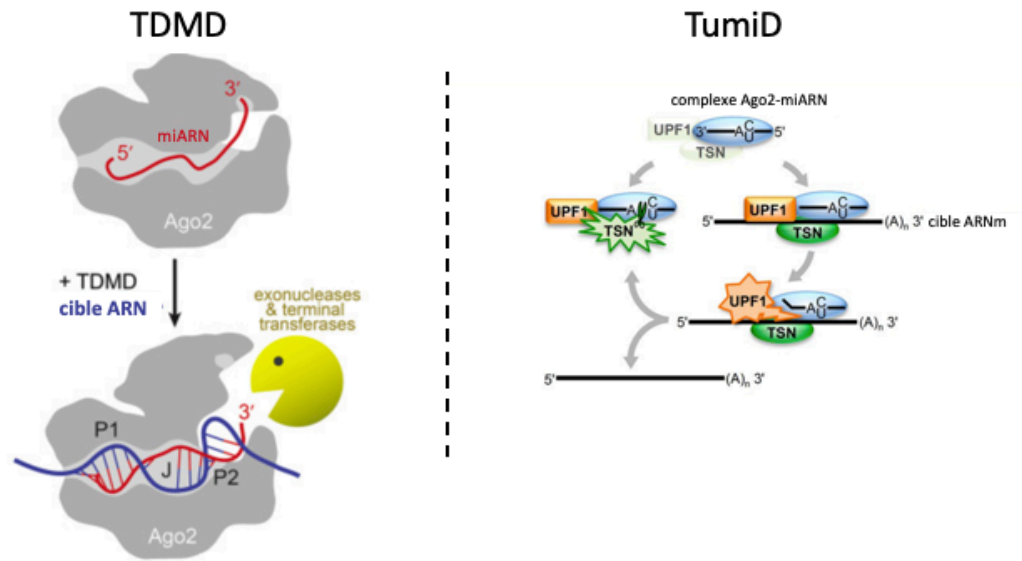


Figure 15 : Recyclage et dégradation du miARN par le mécanisme TDMD ou TumiD TDMD : Target Directed miRNA Degradation Mechanism ; *TumiD* : *Tudor-SN-mediated miRNA endonucleolytic decay* (adaptée de Elbarbary et al., 2017; Pawlica et al., 2020).

9 Modes d'action des miARN

Le mode d'action des miARN est basé sur la fixation du miARN par complémentarité de séquences, ce qui entraîne une répression spécifique de l'expression de sa cible. L'activité des miARN est dictée par le type d'appariement avec un autre ARN. Comme indiqué en préambule, la région la plus importante pour dicter cet appariement est la région *seed* (nucléotide 2 à 7) et la région d'appariement sur l'ARNm définit le MRE. Une récente étude a utilisé la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour préciser les interactions entre le complexe RISC, le miARN et la cible ARN. La longueur de la *seed* conditionne la conformation et la stabilisation de la protéine Ago2 dans le complexe, ce qui la rend active (Baronti et al., 2020). Les MRE sont majoritairement présents sur les 3'UTR des ARNm (Grimson et al., 2007 ; Lewis et al., 2005 ; Lewis et al., 2003). Les paragraphes suivants décrivent les différents modes de régulation transcriptionnels des miARN.

9.1 Régulation de l'expression des gènes

Les miARN sont des régulateurs transcriptionnels majeurs. La répression de l'expression des gènes, médiée par les miARN, se fait par deux mécanismes distincts. Le premier a lieu par clivage de la cible et le second par la déstabilisation de l'ARNm associée à l'inhibition de la traduction.

9.1.1 Dégradation directe de l'ARN cible

Si l'appariement est suffisamment étendu et fait intervenir la partie centrale du miARN, la liaison du miARN incorporé dans la protéine Ago2 catalyse un clivage endonucléolitique de la cible (Figure 16) (Liu et al., 2004 ; Meister et al., 2004). Ce mode de répression est commun chez les plantes (Jones-Rhoades et al., 2006). Il n'a été décrit que pour une vingtaine de transcrits (Shin et al., 2010 ; Yekta et al., 2004). C'est par ce mode de régulation transcriptionnelle que les siARN *small interfering*; (siARN) utilisés à la fois en recherche médicale et en thérapeutique, exercent leur activité sur leur cible (Bobbin & Rossi, 2016 ; Elbashir et al., 2001).

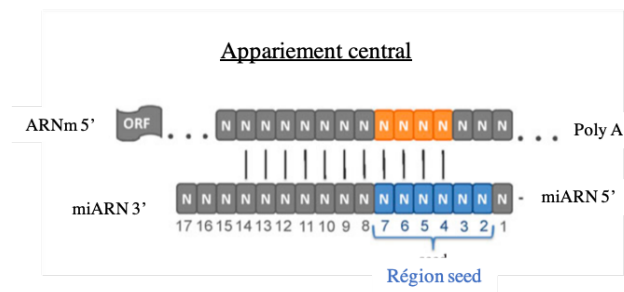


Figure 16 : Appariement central entraînant un clivage de la cible (adaptée de Moszyńska et al., 2017)

9.1.2 Répression transcriptionnelle par déstabilisation de l'ARNm et inhibition de la transcription.

Le complexe RISC recrute la protéine adaptatrice *Trinucleotide repeat-containing gene 6A* (TNRC6) qui interagit avec la poly(A)-binding protéine (PABPC), associée à la queue polyA des ARNm. L'ensemble de ces protéines entraîne le recrutement de déadénylases, comme le complexe poly(A)-nuclease 2- poly(A)-

nuclease3 (PAN2-PAN3), mais de façon plus importante le complexe carbon catabolite repressor 4 (CCR4)- Negative on TATA (NOT) (Behm-Ansmant et al., 2006 ; Ding et al., 2005).

La déadénylation des ARN correspond au raccourcissement de leur queue polyA par une activité exonucléase. Ce phénomène déstabilise l'ARNm (Chen & Shyu, 2011). En parallèle, la traduction est aussi affectée par le recrutement de TNRC6, qui recrute en cascade CCR4-NOT, qui recrute lui-même DEAD-Box Helicase 6 (DDX6) et 4E-T. DDX6, qui participe directement à l'inhibition de la traduction (Chu & Rana, 2006 ; Jonas & Izaurralde, 2015), agit aussi de façon indirecte en se liant à l'eIF4E transporteur (4E-T). Ce transporteur entre en compétition avec Eukaryotic translation initiation factor 4 G (EIF4G) pour la fixation à Eukaryotic initiation factor 4E (EIF4E) pour inhiber la traduction (Kamenska et al., 2016 ; Kamenska A et al., 2014 ; Nishimura et al., 2015 ; Ozgur et al., 2015).

À chaque site de fixation de miARN, la dégradation de l'ARNm sur lequel se trouve le site est estimée à moins de 50 %, et pour beaucoup à moins de 20 % (Baek et al., 2008 ; Selbach et al., 2008). L'existence de plusieurs sites de fixation de miARN sur le même ARNm additionne les effets (Figure 17) (Grimson et al., 2007)

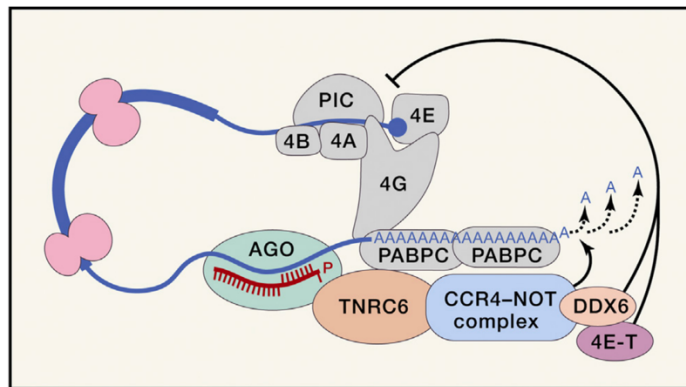


Figure 17 : Mécanisme de répression des ARNm médié par les miARN. Le miARN guide le complexe sur sa cible, ce qui entraîne la répression transcriptionnelle. Les détails de recrutement de ce complexe sont décrits dans le texte. (Adapté de Bartel et al., 2018)

9.2 Reconnaissance de la cible

Initialement, la recherche des appariements du miARN sur les cibles ARN s'est principalement basée sur l'étude de la diminution d'expression des cibles. La reconnaissance de ces dernières, par le complexe Ago-miARN, est soumise à des règles d'appariement bien précises. Comme il a été énoncé en préambule, l'interaction la plus forte en matière d'énergie a généralement lieu entre la région *seed* du miARN et les MRE présents sur les ARN cibles (Grimson et al., 2007 ; Lewis et al., 2005 ; Lewis et al., 2003). Ainsi, l'équipe de David Bartel a défini des motifs récurrents : les MRE canoniques. Des MRE plus atypiques, mais entraînant néanmoins une dégradation des cibles, ont été décrits comme MRE non canoniques (Bartel, 2009).

Toutefois des expériences sans à priori, comme l'immunoprécipitation d'Ago (AgoIP), ont montré qu'étudier seulement la diminution d'expression des cibles, ainsi que se baser uniquement sur les règles précédemment établies, ne permet pas d'identifier de façon exhaustive l'ensemble des sites de liaison (Chi et al., 2009). Premièrement, les appariements n'impliquent pas nécessairement la région *seed*. Ces études ont révélé que les MRE non canoniques représentaient au minimum 40 % de l'ensemble des sites de liaison et possédaient une grande diversité de motifs. La liaison de miARN sur ces MRE non canoniques peut entraîner une diminution de l'expression des cibles, mais moins efficaces. Les MRE non canoniques dont la liaison n'entraînait pas de diminution de l'expression des gènes ont initialement été décrits comme n'ayant aucune fonction. Cependant, l'étude des MRE à la fois canoniques et non canoniques révèle le large spectre de régulation des miARN. Un phénomène de concurrence s'établit entre les différents types de MRE (Loeb et al., 2012a).

9.2.1 MRE canoniques

Les MRE canoniques sont caractérisés par une forte hybridation de la région *seed* à sa cible. La liaison de miARN sur ce type de MRE entraîne une inhibition transcriptionnelle telle qu'elle a été décrite dans le précédent paragraphe, à savoir une inhibition de la traduction associée à une déstabilisation de l'ARNm. On définira

l'efficacité d'un MRE comme étant la capacité de dégradation d'une cible par un miARN lorsqu'il se lie à ce MRE (Bartel, 2018).

On distingue différents types de MRE canoniques. Ils se différencient par le nombre de nucléotides (ou mer) qui s'apparient à la cible. La présence d'une adénosine en première position est souvent retrouvée et il n'y a généralement pas d'appariement entre la région centrale du miARN (nucléotides 9 à 12) à l'ARN cible. Ces différents types de MRE sont représentés dans la figure suivante. Bien que tous puissent entraîner la déstabilisation de l'ARNm, ainsi que l'inhibition de la traduction, ils ne montrent pas tous la même efficacité. En règle générale, parmi les motifs présentés, plus un nombre important de nucléotides est impliqué dans l'appariement, plus il sera efficace. Ceci est illustré dans la figure suivante en bas à droite (Bartel, 2009 ; Brennecke et al., 2005 ; Grimson et al., 2007 ; Moszyńska et al., 2017).

La préférence pour une Adénine en première position ne détermine pas une préférence pour certaines cibles. En effet, cette position n'est généralement pas impliquée dans la liaison entre le miARN et la cible. La préférence pour le A est dictée par le fait qu'Ago possède une poche ayant une affinité supérieure pour le A (Ma et al., 2005 ; Schirle & MacRae, 2012). Il est possible qu'un appariement en 3' soit présent. Il concerne majoritairement les nucléotides 13 à 16. Cet appariement supplémentaire est assez peu compétent pour augmenter l'efficacité des miARN lorsqu'ils se fixent sur ce type de MRE (Bartel, 2009 ; Grimson et al., 2007 ; Salomon et al., 2015 ; Wee et al., 2012).

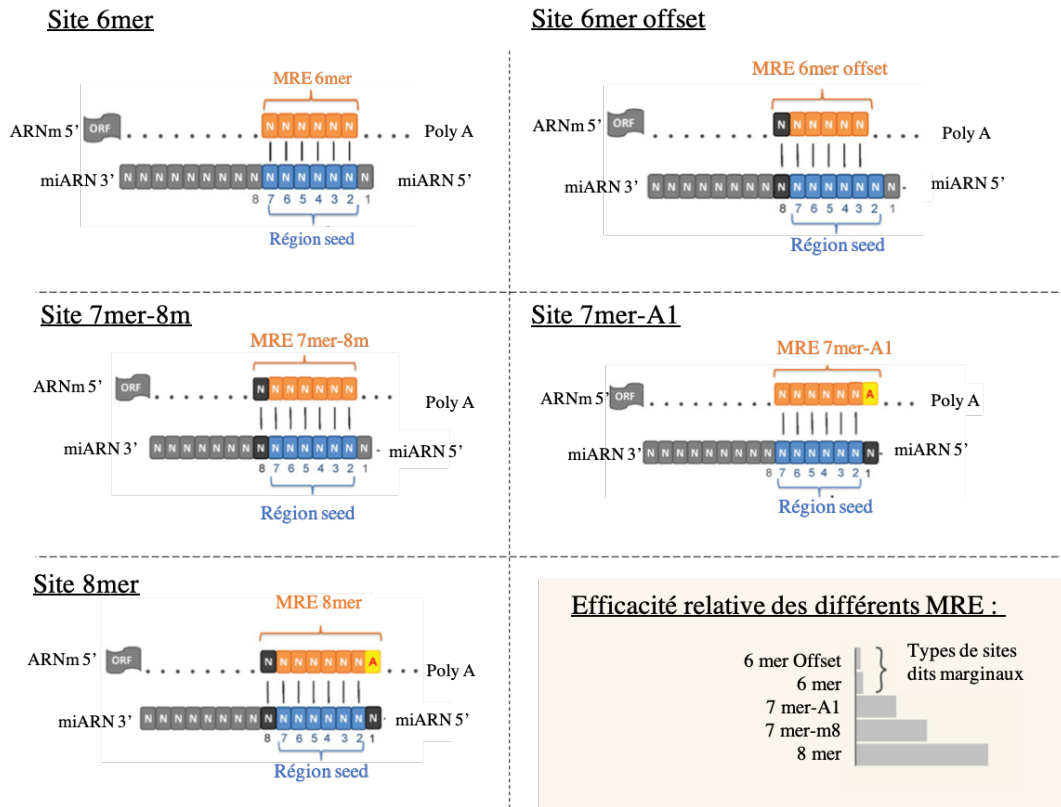


Figure 18 : Illustration des différents MRE (adapté de Bartel, 2018 ; Moszyńska et al., 2017)

9.2.2 Modèle proposé de la reconnaissance de la cible par les miARN au niveau des MRE canoniques

En s'appuyant sur de nombreuses études, David Bartel propose, dans une revue sur les microARN, en 2018, le modèle suivant pour expliquer la reconnaissance des cibles par les MRE canoniques (Figure 19). Dans un premier temps, la conformation tridimensionnelle d'Ago2 ne permet qu'aux nucléotides de 2 à 5 de s'hybrider. Ils sont donc très fortement impliqués dans la recherche de la cible (Étape 1). Ensuite, Ago2 change de conformation et permet aux nucléotides de 6 à 8 de s'hybrider (Étape 2). Une troisième étape vient s'ajouter uniquement pour les MRE ayant une complémentarité supplémentaire en 3', grâce à un autre changement de conformation d'Ago. Pour les MRE centraux qui ont été décrits un peu avant, une quatrième étape vient s'ajouter. Les derniers nucléotides s'apparient ; ce qui entraîne, seulement pour ces derniers, le clivage de la cible. Toutes ces étapes sont réversibles (Bartel, 2018).

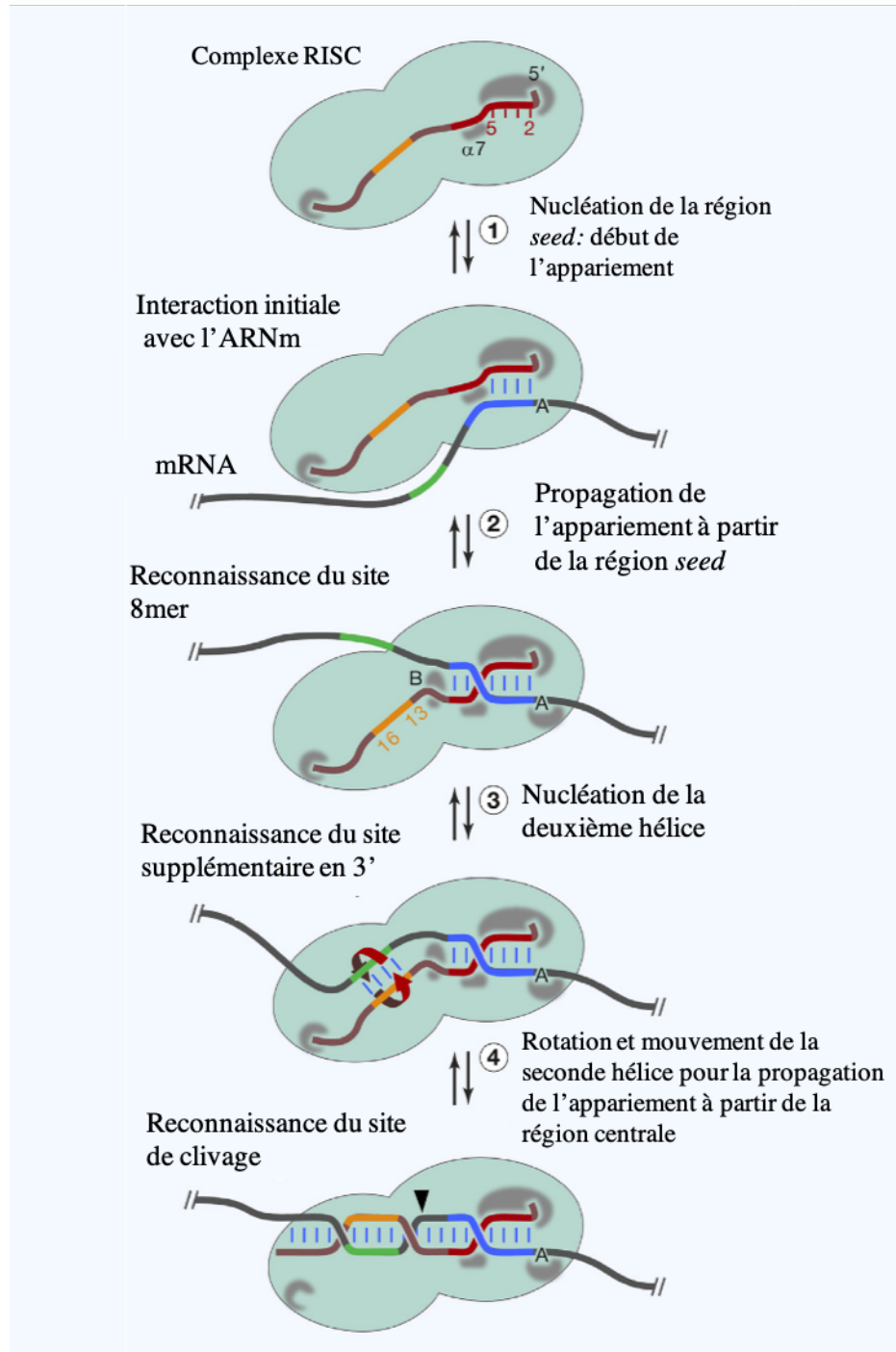


Figure 19 : Schéma du modèle proposé par David Bartel pour la reconnaissance d'un MRE canonique ou central par un miARN (d'après Bartel, 2018)

9.2.3 MRE non canoniques

Il existe des appariements qui ne suivent pas parfaitement les « règles » précédemment énoncées. Dans ces cas, l'appariement de la région *seed* n'est pas parfait. Ces appariements regroupent une classe très hétérogène de motifs qui correspondent

tous à l'interaction entre un miARN et l'ARN. Quelques-uns de ces motifs sont reconnus comme ayant une activité de répression de la transcription. Ces sites non canoniques sont caractérisés par un mésappariement dans la *seed*. Pour compenser, il y a un appariement supplémentaire par des nucléotides en 3'. Un appariement de type wobble, c'est-à-dire une guanine appariée avec une uracile, dans la région *seed*, est aussi possible. Bien que leur activité soit diminuée par rapport à leurs homologues canoniques, les MRE non canoniques ont montré une certaine activité (Doench & Sharp, 2004). Il s'agit des types « GU wobble pairing » ou « appariement complémentaire » (Bartel, 2009 ; Brennecke et al., 2005 ; Moszyńska et al., 2017 ; Shin et al., 2010). De récentes études ont montré que les miARN pouvaient se lier à d'autres ARN avec des motifs beaucoup moins caractéristiques (Gilot et al., 2017 ; Loeb et al., 2012). Ces appariements ne suivent pas forcément de règles pré-établies. Ils sont très peu étudiés car peu d'exemples sont décrits et ils n'entraînent pas la dégradation de la cible sur laquelle ils s'hybrident (Dragomir et al., 2018). Cet aspect sera détaillé dans le paragraphe consacré aux réseaux de miARN.

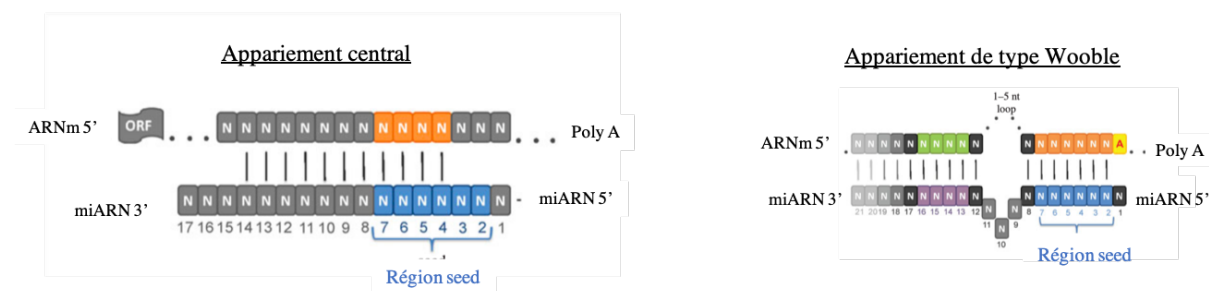


Figure 20 : Représentation schématique des appariements non canoniques de type central et wobble, (d'après Moszyńska et al., 2017)

9.2.4 Des SNP qui conduisent à la formation de nouveaux MRE

Des SNP *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) sont définis comme des mutations présentes à un locus donné, à une fréquence d'au moins 1 % chez l'homme. Ils représentent environ 10 millions de SNP dans le génome humain. Il existe aussi des SNPs sur les 3'UTR des ARNm et ils peuvent se trouver sur le site de fixation d'un miARN sur un ARNm. De ce fait, l'activité du miARN peut être : soit augmentée, soit

diminuée. Cette dérégulation peut être à l'origine de pathologies telles que le cancer (Moszyńska et al., 2017 ; Salzman & Weidhaas, 2013).

9.3 Fonctions non classiques des miARN

Les miARN sont principalement décrits comme étant des régulateurs transcriptionnels majeurs, exerçant leur activité par dégradation de l'ARNm ou par inhibition de la traduction. Bien qu'elles soient moins nombreuses, il existe des études décrivant d'autres modes d'actions des miARN (Bartel, 2018).

L'étude d'Eiring et de ses collaborateurs décrit la liaison du miR-328 sur la ribonucléoprotéine hétérogène E2 (hnRNP E2). Ce miARN possède une séquence riche en Uracile et Cytosine qui est très ressemblante au site de liaison de hnRNP E2 sur l'ARNm *CCAAT/enhancer-binding protein alpha CEBPA*. En se liant sur hnRNP E2, il permet la libération de *CEBPA* et empêche ainsi l'inhibition de sa traduction par hnRNP E2 (Eiring et al., 2010). Cet exemple décrit une activation indirecte de la traduction.

Les miARN peuvent également activer directement la traduction de transcrits, notamment durant certaines étapes du cycle cellulaire. Le miR-369-3, par exemple, s'associe à Ago et à la Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 (FXR1) pour activer le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) en se liant sur des séquences riches en UA. La même observation a été faite avec let-7 qui augmente la traduction ou la réprime, selon les phases du cycle cellulaire (Vasudevan et al., 2007).

Le miR-181c peut se transloquer dans la mitochondrie des cellules cardiaques pour cibler la sous-unité 1 de la cytochrome C oxydase (MT-COX1), codé par la mitochondrie, pour en inhiber l'expression. L'étude montre que le miARN exerce son activité principalement en agissant sur la traduction et non sur l'expression de l'ARNm (Das et al., 2012).

Un autre exemple décrit l'activation du récepteur de type Toll (TLR) par le miR-21 et miR-29a ; ce qui participe à la réponse inflammatoire dans certains cancers pulmonaires (Fabbri et al., 2013).

De même que le miR-181c agit dans la mitochondrie, certains miARN peuvent être importés dans le noyau avec l'Ago1 et Ago2 par l'Importine 8. C'est le cas, par

exemple, du miR-589 qui, associé à Ago2, se lie au promoteur de la cyclo-oxygénase (COX2) et induit sa traduction (Matsui et al., 2013) . Le miR-709 murin est aussi décrit comme ayant un rôle dans le noyau. Il peut interagir avec le pri-miR-15a/16-1 et ainsi inhiber sa maturation.

Ces exemples non exhaustifs illustrent les nombreux rôles que peuvent avoir les miARN. Tous ne sont pas encore bien décrits ni caractérisés.

10 Prédiction bio-informatique des cibles de miARN et confirmation biologique

10.1 Prédiction bio-informatique

Toutes les règles qui ont été établies concernant les MRE et le développement du séquençage à haut débit ont permis de développer des outils bio-informatiques pour prédire les potentielles cibles d'un miARN donné. L'enjeu de ces outils est d'être suffisamment stricts dans les critères d'appariement pour ne pas tolérer trop de faux positifs, sans l'être trop pour ne pas perdre d'informations. De plus, des critères de conservation dans l'évolution sont parfois appliqués (Bartel, 2009). Parmi les outils en ligne les plus performants et les plus utilisés, on retrouve TargetScan¹, PicTar², microRNA.org (MiRanda)³, Diana⁴. Ces outils de prédiction ont des taux de recouvrement assez importants. Pour autant, le recouvrement n'est pas de 100 %. Cela est dû à l'utilisation de différents algorithmes, ainsi que de différentes bases de données pour les séquences des 3'UTR et celles des miARN (Bartel, 2009).

Ces algorithmes sont puissants pour prédire les MRE dont les motifs sont bien caractérisés, notamment les canoniques ou les non canoniques déjà décrits (un seul

¹ http://www.targetscan.org/vert_72/

² <https://pictar.mdc-berlin.de>

³ <http://www.microna.org/microna/home.do>

⁴ <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>

mésappariement ou un appariement *wobble* dans la région *seed*). Cependant, pour ce qui concerne les MRE non canoniques avec des motifs atypiques, il est beaucoup plus difficile de les prédire car il n'y a, par définition, pas de motifs consensus du fait du nombre restreint d'exemples décrits. Il existe cependant des algorithmes qui se basent sur l'énergie de liaison nécessaire à l'hybridation d'un miARN sur un ARN. Plus cette énergie est faible, plus la probabilité d'interaction est forte. Cet algorithme nécessite la connaissance du miARN et de la potentielle cible (Krüger & Rehmsmeier, 2006). Bien que ces outils soient puissants, de nombreux paramètres, comme la conformation tridimensionnelle ou l'encombrement de ces ARN par des protéines de liaison, sont exclus de ces prédictions ; c'est pourquoi des validations biologiques sont nécessaires.

10.2 Validations biologiques

Plusieurs expériences de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence ces interactions entre miARN et ses partenaires.

10.2.1 Immuno-précipitation pour identifier les ARN liés aux miARN

Ces méthodes sont principalement des précipitations après que les interactions entre les miARN et leurs partenaires aient été stabilisées. Le plus souvent, cette stabilisation se fait par « liaison covalente induite ». Ensuite, il est possible d'immuno-précipiter Ago2. Cette technique, lorsqu'elle est suivie par une étape de séquençage à haut-débit, s'appelle le *Cross-Link Immuno-precipitation* couplée à du séquençage (CLIP-Seq) (Hausser & Zavolan, 2014). Il existe des dérivés du CLIP ; par exemple, l'individual-nucleotide resolution UV-crosslinking and immunoprecipitation (iCLIP). Il s'agit d'une méthode plus résolutive à l'échelle du nucléotide (Huppertz et al., 2014). Parmi les dérivés, on retrouve également le photoactivable ribonucleoside-enhanced CLIP (PAR -CLIP) (Hafner et al., 2010), le cross-linking ligation and sequençage of hybrids CLASH (Helwak et al., 2013), covalent ligation of endogenous Argonaute-bound RNA-CLIP (CLEAR-CLIP) (Moore et al., 2015). Cette technique, ainsi que ses dérivés, ont l'avantage de ne pas nécessiter la connaissance à priori du miARN ou de l'ARN sur lequel il se fixe. De plus, grâce à cette technologie, le miARN et l'ARN

potentiel avec qui il interagit sont étudiés sans surexpression exogène qui peuvent perturber les conditions cellulaires ainsi que les conformations secondaires et ainsi les interactions avec les protéines sont maintenues. Cependant, face au grand nombre de technologies et de protocoles bio-informatiques, il est difficile de comparer des résultats obtenus avec deux méthodes différentes par manque de standardisation (Migault et al., 2017).

10.2.2 Technologie MS2-RIP pour identifier les miARN liés à un ARN donné

Il est également possible d'identifier les miARN qui interagissent avec un ARN particulier. Dans ce cas, une des technologies les plus adaptées est le MS2-RNA immuno-précipitation (MS2-RIP). Il s'agit d'une méthode robuste basée sur l'immuno-précipitation d'une construction artificielle composée de la région à étudier fusionnée à des boucles MS2. Les cellules doivent exprimer une protéine MS2 couplée à de la GFP. Un anticorps anti GFP est utilisé pour l'immuno-précipitation (Tominaga et al., 2011). Des alternatives basées sur l'affinité GST-Glutathione S transferase existent aussi. Cette immuno-précipitation peut être suivie par un séquençage des miARN pour identifier les miARN fixés sur un ARN précis. Il s'agit d'une technologie efficace et qui permet de collecter une quantité d'échantillon suffisante pour permettre un séquençage des miARN. Des constructions mutantes pour les sites de liaison prédits grâce aux approches bioinformatiques permettent de valider les MRE. Cependant, cette technologie comporte certaines limites. Premièrement, l'ARN suspecté d'interagir avec des miARN ne peut excéder une certaine taille pour pouvoir être transfecté dans les cellules. De plus, le fait qu'il s'agisse d'une construction artificielle peut entraîner un biais, par la perte d'éventuelles structures secondaires ou liaisons avec des protéines. Ces biais peuvent entraîner des faux positifs en permettant la liaison de miARN qui ne pourraient se lier physiologiquement. De plus, cette technologie ne permet d'étudier que des partenaires de miARN prédéterminés ou suspectés (Migault et al., 2017).

10.2.3 Technologie du miARN biotinylé pour identifier les ARN liés à un miARN donné

À l'inverse, lorsqu'on veut étudier les ARN partenaires d'un miARN, il est possible d'utiliser un miARN artificiellement modifié auquel est ajouté un groupement biotine. Les miARN modifiés sont transfectés dans les cellules. Après une lyse cellulaire, il est possible, grâce à des billes couplées à la streptavidine, de précipiter les ARN associés à un miARN. Différents protocoles existent. Certains utilisant la stabilisation de l'interaction à l'aide des UV (*crosslink* par les UV), alors que d'autres limitent les faux positifs en supprimant cette étape. Cette technologie peut être suivie par un séquençage précis des ARN liés à ces miARN appâts (Tan & Lieberman, 2016).

10.2.4 Surexpression ou sous expression du miARN pour identifier ses partenaires

Il est également possible d'identifier les partenaires d'un miARN en mesurant l'expression des potentiels partenaires lorsque le miARN est surexprimé. Cette surexpression peut se faire par transfection de miARN synthétiques. L'expression des cibles du miARN est donc réduite par la surexpression du miARN.

À l'inverse, utiliser des inhibiteurs de miARN (anti-miR) est complémentaire et doit entraîner des résultats, comme la surexpression des cibles du miARN. Ces expériences permettent de mettre en évidence les partenaires des miARN, mais aussi des partenaires indirects dont le changement du profil d'expression est le résultat du changement d'expression des partenaires directs (Migault et al., 2017).

10.2.5 Validation des MRE par des gènes rapporteurs

Ensuite, pour valider les interactions entre un miARN et son partenaire, ou valider un MRE, des expériences utilisant des rapporteurs luciférases peuvent être utilisées (Mullokanov et al., 2012). Il s'agit d'une construction artificielle composée du gène de la luciférase couplé à une séquence contenant les MRE. En présence de MRE canoniques, la fixation du miARN sur l'ARN devrait induire la dégradation de

l'ARN et donc réduire la production de luciférase ; ce qui provoque une baisse de l'activité enzymatique qui est mesurable. À l'inverse, des MRE non canoniques devraient entraîner peu ou pas de perturbation de l'activité luciférase. Cette technologie permet de valider les MRE en utilisant des constructions mutantes de la zone de fixation putative du miARN. Cette technique permet de valider les sites de liaison (Migault et al., 2017 ; Tan & Lieberman, 2016).

10.3 Proportion des différents types de MRE

10.3.1 Abondance des MRE canoniques

Les MRE canoniques sont des séquences de petite taille. De ce fait, la probabilité de les retrouver sur les 3'UTR des ARNm est très importante. Si l'on ne considère que les MRE dont l'appariement concerne 7 ou 8 nucléotides, il est estimé que chaque miARN possède environ 300 sites de liaison dans le génome humain. Ce chiffre passe à plus de 500 lorsque l'on considère les MRE ne faisant intervenir que 6 nucléotides. La dernière implémentation de miR-base répertorie 2 654 miARN matures (Kozomara et al., 2019). Si l'on prenait en considération 500 sites de liaison par miARN, on compterait sur le transcriptome humain plus de 1 300 000 MRE. Il se peut que, sur un même 3'UTR, il y ait plusieurs MRE pour un miARN donné. De ce fait, il est estimé qu'en moyenne (malgré cette redondance), un miARN aurait environ 400 cibles (Friedman et al., 2009). Des expériences d'IP Ago associées au séquençage haut débit ont montré que les miARN ne s'hybridaient pas que sur les 3'UTR. En effet, on retrouve des MRE également sur les régions 5'UTR, ainsi que dans les cadres ouverts de lecture (ORF : Open Reading Frame). Les ARNm ne sont donc pas les seules cibles des miARN. Les ARNnc tels que les ARNinc ou les ARN circulaires (ARNcirc) possèdent des sites de fixation pour les miARN (Figure 21) (Chi et al., 2009 ; Lewis et al., 2005).

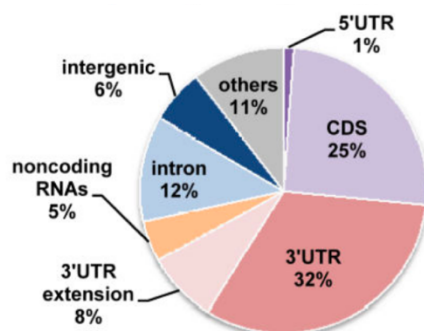


Figure 21 : Proportions des différents sites de localisation des MRE (Chi et al., 2009)

10.3.2 Abondance des MRE non canoniques et leurs conséquences

Les MRE non canoniques identifiés expérimentalement par différentes technologies d'immuno-précipitation représentent plus de la moitié des sites de liaison des miARN sur leur cible (Agarwal et al., 2015 ; Kim et al., 2016). Ces MRE ont initialement été décrits comme étant le produit d'artefacts liés à la technologie d'identification. Ils étaient reconnus comme n'ayant pas de fonction biologique, car la fixation d'un miARN sur de tels MRE n'entraîne pas, ou peu, la dégradation de cet ARN. L'existence de ces MRE a été prouvée *in vivo*, notamment en utilisant un modèle murin déficient pour le miR-155 *versus* le même modèle sauvage. Ceci dans le but d'identifier uniquement les sites de liaison de ce miARN. Cette étude révèle *in vivo* que plus de la moitié des sites de liaison du miARN sont non canoniques (Loeb et al., 2012).

Cette fixation a des conséquences majeures sur le transcriptome. En effet, la liaison du miARN sur les MRE non canoniques le rend moins disponible pour se lier sur les MRE canoniques et entraîner la dégradation de la cible. La quantité de miARN dans la cellule ne permet pas de saturer l'ensemble des sites de fixation. De ce fait, il existe un phénomène de compétition entre les sites de fixation.

11 Réseau de miARN, ceARN et éponges à microARN

Pendant longtemps, les miARN ont été étudiés de manière individuelle. Leur activité était généralement observée sur une ou quelques cibles en particulier. Or les miARN peuvent réguler plusieurs cibles et, réciproquement, une cible donnée peut être

régulée par plusieurs miARN. Ceci permet de définir des réseaux entre les miARN et leurs cibles respectives, on parle de réseau de miARN (Friedman et al., 2009). Au sein de ces réseaux, il existe une compétition pour la fixation des miARN sur les cibles. En effet, l'activité des miARN est dépendante de l'expression du miARN et du nombre de sites de liaison disponibles. Ce nombre de site est appelé l'abondance en sites de liaison (ou Target Site Abundance en anglais : TSA). Ces compétitions ont initialement été identifiées expérimentalement en utilisant des constructions artificielles contenant plusieurs sites de fixation pour les miARN. Ces constructions sont appelées des éponges à miARN. L'existence de ces compétitions, ainsi que d'éponges endogènes, a été découverte plus tard (Salmena et al., 2011).

11.1 Les éponges à miARN artificielles

Les compétitions entre les cibles MRE pour la liaison d'un miARN, chez les mammifères, ont initialement été montrées avec des constructions artificielles appelées éponges à miARN (Ebert et al., 2007). Ces constructions d'ADN contiennent un promoteur fort et de nombreux MRE identiques. Les MRE étant complémentaires de la région *seed* d'un miARN, l'éponge est un inhibiteur pour une famille de miARN précis. Ces constructions sont transfectées dans les cellules, elles sont transcrites et deviennent des inhibiteurs exogènes. Il y a donc une compétition entre les MRE endogènes et ceux présents sur ces transcrits. Ces éponges ont montré une inhibition de l'activité du miARN au moins aussi importante que les oligonucléotides anti-sens utilisés comme inhibiteurs. Elles ont été utilisées *in vitro* et *in vivo* (Ebert et al., 2007 ; Ebert & Sharp, 2010b ; Migault et al., 2017).

11.2 Compétition endogène pour la liaison des miARN

Ce phénomène de compétition a été mis en évidence également *in vivo*. L'affinité du complexe Ago/miARN pour une cible n'est pas le seul facteur qui détermine l'efficacité d'inhibition transcriptionnelle. En effet, il faut y ajouter la concentration du miARN et l'expression de l'ensemble des cibles (ratio entre la concentration du miARN/cibles). Lorsque ce ratio est faible, le niveau de répression transcriptionnel est

également faible tel que le montre la Figure 22 (Bosson et al., 2014 ; Doench & Sharp, 2004). Comme certaines cibles possèdent plusieurs MRE, il est plus juste de prendre en compte la TSA. L'activité des miARN est donc dépendante à la fois de leur concentration et de la disponibilité des sites de liaison. Ce phénomène peut expliquer le fait que l'abolition de l'expression d'un seul miARN a montré, dans de nombreuses expériences, que le phénotype est peu affecté ; ce qui sous-entend une redondance de l'activité des miARN (Arvey et al., 2010).

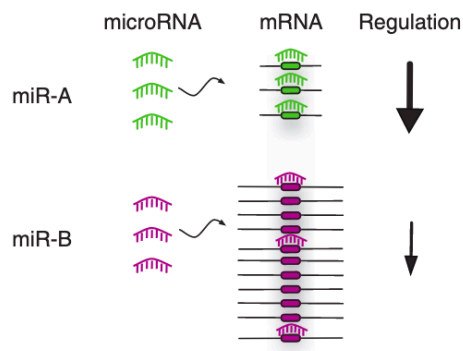


Figure 22 : L'efficacité d'un miARN est dépendante de la TSA (d'après Arvey et al., 2010)

Comme cela a été présenté précédemment, de très nombreux MRE sont retrouvés sur la partie 3'UTR des ARNm. Cependant, les miARN peuvent également se lier sur des MRE présents sur d'autres ARN : sur des ARN longs non codants (ARNlnc) ou sur des pseudogènes. Ces ceARN peuvent influencer l'activité des miARN au sein de la cellule, notamment en influençant leur disponibilité (Salmena et al., 2011).

11.2.1 Les pseudogènes peuvent être des ceARN

Les pseudogènes sont des locus génomiques qui, pour la majorité d'entre eux, ne codent pas pour des protéines. Ceci est dû à la présence de mutations, de codons STOP prématurés ou au fait qu'ils soient dépourvus de promoteurs classiques. En raison de leur grande homologie de séquence avec les ARNm, les pseudogènes peuvent être considérés comme des ceARN compétiteurs importants. Selon leur niveau d'expression, ils peuvent réguler un ARNm par l'intermédiaire de la disponibilité des miARN (Poliseno et al., 2010 ; Tay et al., 2011). Le pseudogène *Phosphatase And Tensin*

Homolog Pseudogene 1 PTENP1, qui partage une grande homologie avec le puissant gène suppresseur de tumeur *Phosphatase and TENsin homolog* (PTEN), présente plusieurs MRE communs avec *PTEN*. La surexpression de la région 3'UTR de *PTENP1* augmente le niveau d'expression de *PTEN*. Cette régulation du gène par son pseudogène correspondant est perdue dans les cellules dont la voie de biogénèse des miARN est altérée (inactivation de Dicer). L'étude a donc montré que la région 3'UTR d'un pseudogène peut entrer en compétition pour la liaison de miARN avec son gène correspondant (Poliseno et al., 2010). Des résultats similaires entre des ARNm et le pseudogène partenaires ont été démontrés, dans cette même étude, entre l'ARNm *KRAS* et le pseudogène *KRASIP* (Poliseno et al., 2010)

11.2.2 Les ARNlnc peuvent être des ceRNA

Les ARNlnc peuvent eux aussi être des ceARN. De nombreux ARNlnc sont connus pour avoir une localisation nucléaire ou avoir des niveaux d'expression faible. Ils ne sont donc pas considérés comme des ceARN efficaces (Tay et al., 2014). Cependant, les ARNlnc ont, pour beaucoup d'entre eux, une expression stade du développement spécifique, ou lignée cellulaire spécifique ou tissus-spécifique. De ce fait, dans certaines conditions, un ARNlnc donné peut être un ceARN sans qu'il le soit systématiquement. L'ARNlnc *Highly up-regulated in liver cancer (HULC)* est surexprimé dans les cancers hépatocellulaires. Il possède des MRE pour le miR-327 (MRE-327). La surexpression de ce lncRNA réduit l'activité de ce miARN, ce qui réduit aussi l'inhibition de ses cibles comme *Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Beta PRKACB*. Les ARNlnc ont également une fonction non codante ayant un rôle dans le développement. L'ARNlnc *LINCMD1* possède des MRE pour le miR-133 et miR-135 qui régulent *Mastermind-like protein 1 (MAML1)* et *Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C)*. Ces deux derniers sont des facteurs de transcription spécifiques du muscle. Ce miARN, en contrôlant l'activité des miR-133 et miR-135, contrôle l'activité du développement musculaire (Tay et al., 2014).

11.2.3 CircARN comme ceARN

Les circARN sont des transcrits issus d'un épissage particulier, dit *backsplicing* en anglais, d'un pré-ARNm. La structure se lie au niveau d'un site de jonction pour conduire à une molécule d'ARN simple brin circulaire, donc dépourvue de queue poly-A et de coiffe en 5'. Cette structure leur confère une grande stabilité, car ils sont résistants aux exonucléases. Ces circARN peuvent être composés à la fois d'exons et/ou d'un intron (Mitra et al., 2018).

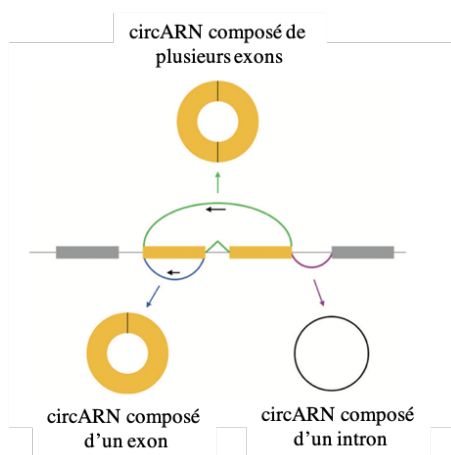


Figure 23 : Formation des circARN. Un circARN peut être composé d'un seul ou de plusieurs exons ou d'un intron (adaptée de Mitra et al., 2018)

Les circARN contiennent de nombreux MRE, permettant la liaison des miARN. De ce fait, dès lors qu'ils sont fortement exprimés, ils ont un rôle de ceARN. Ces circARN sont des éponges à miARN naturelles (Mitra et al., 2018). Par exemple, le circARN *Cerebellar degeneration-related protein 1 CDR1as*, un transcript antisens de *cerebellar degeneration-related protein 1*, (CDR1) contient 63 sites de liaison pour le miR-7. Ce circARN identifié chez le poisson zèbre n'est pas un exemple isolé. Il est également présent chez l'homme et possède une fonction miR-7 indépendante dans le mélanome (Douglas Hanniford et al., 2020). De nombreux circARN ayant une fonction d'éponge à miARN sont régulièrement décrits. À titre d'exemple, le circARN issu du gène *sry* est une éponge pour le miR-138 (Guo et al., 2014).

11.3 Éponge à miARN endogènes

Quelques années avant que le concept de ceARN ait été identifié chez les mammifères, des éponges miARN ont été identifiées chez la plante *Arabidopsis thaliana* par Franco-Zorrilla et ses collègues. Dans leur étude, il s'agit d'une surexpression de l'ARN *Induced by Phosphate Starvation 1* (IPS1). Cet ARN, à l'exception d'un mésappariement, est complémentaire du miR-399. Les auteurs, à défaut d'observer un clivage de l'ARN *IPS1*, ont remarqué une dé-répression d'au moins une des cibles du miR-399 ; ce qui montre une séquestration du miARN. Ils ont nommé ce mécanisme « *target mimicry* » (Franco-Zorrilla et al., 2007).

Ces éponges à miARN ne sont pas dégradées par la fixation du miARN. De ce fait, le miARN se trouve séquestré. Cette différence serait due à la nature des MRE. En effet, les ceARN sont composés de MRE canoniques, alors que les éponges à miARN endogènes comportent des MRE non canoniques ne permettant pas leur dégradation. Il est important de mettre à part les circARN. Ces molécules ne seraient pas non plus dégradées, non pas en raison des MRE mais, probablement, en raison de leur structure circulaire qui les rend insensibles à l'activité des nucléases (Guo et al., 2014).

L'équipe de Marie-Dominique Galibert a montré qu'un ARNm *Tyrosinase-related protein 1* (*TYRP1*) pouvait également exercer une fonction d'éponge à miARN dans le mélanome cutané. *TYRP1*, impliqué dans le processus de pigmentation, est très fortement exprimé dans le mélanome cutané (>3000 copies/cellule). Cette fonction non codante a été montrée par l'étude de la région 3'UTR en utilisant la technique du MS2-RIP suivi par un séquençage des miARN immuno-précipités. De façon inattendue, car non prédit par les logiciels de prédiction comme Targetscan, le miR-16 a été identifié comme interagissant de *TYRP1*. Le logiciel de prédiction RNAhybrid a révélé que la liaison du miR-16 se faisait sur l'ARNm *TYRP1* sur un MRE non canonique. Cependant, il ne correspond pas aux MRE non canoniques précédemment décrits (ni l'appariement *wooble* ni l'appariement central). Cette liaison non canonique ne permet pas au complexe miARN/RISC d'entraîner la dégradation de *TYRP1*. Le miR-16 ainsi fixé est séquestré et ne peut plus exercer son activité de régulateur transcriptomique sur ces cibles possédant des MRE-16 canoniques. De plus, son expression très élevée lui

permet de séquestrer l'ensemble des miR-16 présents dans les cellules de mélanome. Le miR-16 a une activité suppresseur de tumeur dans les cellules de mélanome. Il a pour cible des ARNm comme *RAB17*, dont l'inhibition d'expression ralentit la prolifération cellulaire. Ainsi, l'équipe a montré l'existence de MRE non canoniques fonctionnels malgré le fait qu'ils ne conduisent pas à une répression transcriptionnelle. En effet, en séquestrant le miR-16, la région 3'UTR de *TYRP1* est une éponge à miARN endogènes qui participe à la tumorigénèse des mélanomes. De plus, la liaison du miR-16 sur *TYRP1* entraîne une surexpression de l'ARNm et de la protéine TYRP1, suggérant un rôle stabilisateur (Gilot et al., 2017).

Alors que les MRE non canoniques avaient été décrits comme étant non fonctionnels, notamment par l'équipe de David Bartel, ces résultats apportent la preuve qu'ils ont une fonction régulatrice, même s'ils n'entraînent pas de dégradation directe.

11.4 « Langage des MRE »

Plusieurs hypothèses concernant les compétitions pour la fixation de miARN se sont succédées. Dès 2009, Seitz proposait un modèle dans lequel certaines cibles auraient une affinité inférieure, ce qui leur donnerait le statut de pseudo-cibles (ou *pseudotarget* en anglais), contrairement aux cibles dites légitimes. Ces deux classes de cibles ont été déterminées uniquement par prédiction *in silico*. Mais ces prédictions ne se concentraient que sur les ARNm.

Pier Paolo Pandolfi propose un modèle selon lequel, au même titre que les miARN régulent la fonction des ARN, la réciproque est aussi vraie. Le ceARN pourrait moduler la disponibilité des miARN. Pier Paolo Pandolfi propose ainsi de voir cette compétition comme un langage où les MRE seraient les lettres. Le partage des mêmes MRE par des ARN différents conduit à des régulations en *trans* entre différents ARN. Il ajoute que non seulement les ARN non codants peuvent être des ceARN et participer à cette régulation, mais aussi que différents ARNm partageant des MRE pour le même miARN sur leur 3'UTR peuvent entrer en compétition et donc induire une régulation croisée (Figure 24).

Pier Paolo Pandolfi propose des conditions pour que ce réseau puisse être efficace dans la cellule. Premièrement, comme pour les cibles, la concentration relative entre

les miARN et les ceARN est cruciale. Outre la concentration, un élément important est le nombre de microARN qui peuvent se lier sur le compétiteur. Ce paramètre est influencé par le nombre de MRE présents, mais également par l'accessibilité du compétiteur, sa localisation cellulaire, ses liaisons avec d'éventuelles protéines de liaison aux ARN. Le partage de différents MRE par un même ceARN fait que ces réseaux ne sont pas centrés autour d'un seul miARN, mais bien autour de miARN différents. Pour finir, tous les MRE n'ont pas la même affinité pour les miARN, et donc n'exercent pas le même niveau de compétition.

L'identification des éponges ARN endogènes, comme *TYRPI* (Gilot et al., 2017), ajoute encore de la complexité à ce langage entre les MRE. En effet, il faut tenir compte des MRE canoniques et non canoniques. Ces derniers possèdent une affinité de liaison inférieure aux MRE canoniques. Cependant, si la concentration de ces éponges est élevée, ils peuvent exercer un rôle important dans la cellule. Leur identification est compliquée par le fait qu'ils ne peuvent actuellement pas être prédits par des logiciels bio-informatiques. Cela est dû au fait qu'il n'existe pas de motifs consensus pour ces MRE non canoniques. Ils ne peuvent pour l'instant être découverts qu'expérimentalement, puis être confirmés par des logiciels comme RNAhybrid (Migault et al., 2017).

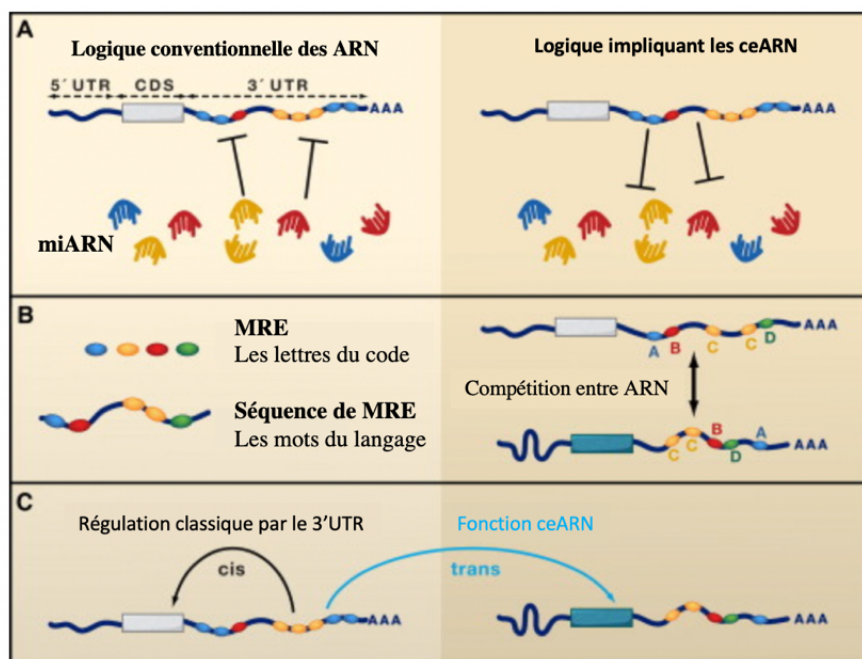


Figure 24 : Régulation réciproque entre les miARN et les ARNm. (A) Selon la logique conventionnelle, seul le miARN régule l'ARNm ; cependant, les ARNm peuvent aussi réguler

l'activité des miARN ; (B) Les molécules d'ARN peuvent communiquer entre elles par la liaison des miARN sur les MRE, ce qui définit un « langage des MRE » ; (C) Les régions 3'UTR des ARNm contiennent des MRE qui fonctionnent en cis pour réguler la molécule d'ARN elle-même, mais aussi éventuellement en trans pour réguler les niveaux de microARN et donc d'autres ARN.

Pour conclure, l'activité des miARN ne dépend pas que de leur expression dans la cellule. Elle est dépendante de leur disponibilité et de l'expression de tous les partenaires du miARN. Il serait intéressant d'étudier les différences de disponibilité d'un miARN dans différents cancers et pour différents patients pour lesquels l'événement causal du cancer n'a pas été identifié. Les miARN étant décrits pour la plupart comme ayant des rôles soit suppresseurs de tumeur soit oncogènes, en fonction de leur cible, leur disponibilité pourrait être une cause directe de la croissance tumorale. Cela ouvre de nouvelles perspectives tant au niveau diagnostique que thérapeutique. En effet, au-delà de chercher d'éventuelles mutations, il faudrait analyser l'expression de gènes dont la fonction protéique n'est pas nécessairement associée à la progression tumorale, mais qui régulent l'activité de miARN.

Deuxième partie : Du mélanocyte aux mélanomes uvéaux

1 Les mélanocytes et la production de mélanine

1.1 Origine des mélanocytes

Les mélanocytes dérivent des cellules souches de la crête neurale. Ces cellules dendritiques ont pour progéniteurs les mélanoblastes, qui se différencient à partir de cellules souches multipotentes. Elles sont dotées d'une grande capacité migratoire qui leur permet de rejoindre leur localisation définitive et de se différencier (Larue et al., 2003). Leur différenciation en un type cellulaire spécifique est sujette à débat. En effet, deux modèles s'opposent. L'un d'eux propose que leur devenir n'est pas dicté par leur migration, mais prédéterminé avant la migration. Ceci a été démontré en étudiant la différenciation *in vitro* de cellules de la crête neurale. Isolées, elles se différencient en plusieurs types cellulaires. Cette observation sous-entend qu'il n'est pas nécessaire qu'elles migrent et atteignent une localisation précise pour se différencier en un type cellulaire particulier (Henion & Weston, 1997). L'autre modèle, au contraire, propose que les cellules de la crête neurale soient des cellules multipotentes qui se différencient après leur migration, en fonction de l'environnement. Rien n'exclut la coexistence des deux modèles (Harris & Erickson, 2007).

La majorité des mélanoblastes atteignent leur localisation finale entre la 8^e et la 14^e semaine de développement embryonnaire (Cichorek et al., 2013). L'un des facteurs les plus importants de cette spécification est le facteur de transcription *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF). Son expression marque l'entrée des cellules dans la lignée mélanocytaire (Mort et al., 2015).

1.2 La production de mélanine

Les mélanocytes sont les cellules à l'origine de la production de mélanine. On distingue trois types de mélanine : l'eumélanine (couleur brune), la phéomélanine

(couleur jaune-orange) (Thody et al., 1991), et la neuromélanine (couleur noire). Ce dernier pigment n'est retrouvé que dans le cerveau, et n'est pas produit par les mélanocytes mais par les neurones (Zecca et al., 2008). Le précurseur commun de ces pigments est la tyrosine. S'ensuit une cascade enzymatique générant différents intermédiaires comme la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) et la dopaquinone aboutissant à la synthèse d'eumélanine et de phéomélanine (D'Mello et al., 2016).

Ces deux pigments, chimiquement différents, possèdent des propriétés physico-chimiques différentes, notamment concernant la protection contre les rayons ultraviolets (UV). Ces différences seront détaillées par la suite dans les paragraphes expliquant le rôle des mélanocytes selon leur localisation. Les mélanocytes contenant de l'eumélanine ont également la propriété de neutraliser les radicaux libres en les réduisant ou en les oxydant (Rózanowska et al., 1999).

1.3 Localisation des mélanocytes

La majorité des mélanocytes sont retrouvés au niveau de la peau et du bulbe des cheveux. Cependant, ils sont aussi présents au niveau de l'oreille interne, de l'œil, des méninges et du cœur (Figure 25) (Plonka et al., 2009).

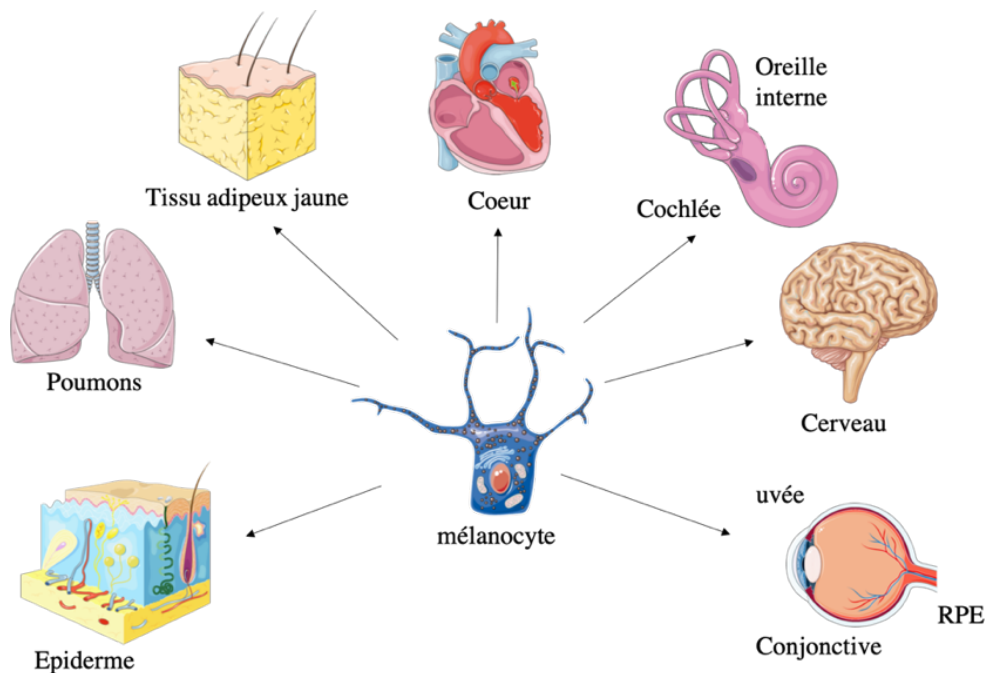


Figure 25 : Les mélanocytes sont retrouvés dans divers endroits du corps humain. On en trouve principalement au niveau de la peau, mais également dans les poumons, le tissu adipeux, le cœur, l'oreille, le cerveau et l'œil (schéma adapté de Plonka et al, 2009).

1.3.1 Les mélanocytes cutanés

Les mélanocytes cutanés représentent la majorité des mélanocytes chez l'homme. Ils sont impliqués dans le phototype de la peau étant responsables du phénomène de pigmentation. On distingue deux types de pigmentation. La pigmentation constitutive, qui est le résultat du programme génétique, et la pigmentation photo-induite ou facultative, plus communément appelée bronzage, résultat d'une exposition directe aux UV. La seconde est réversible. Cependant, ce type de pigmentation est dépendant des capacités adaptatives de la peau aux agressions induites par les UV. Elle est également dépendante du programme génétique (Quevedo et al., 1975). Les capacités adaptatives de la peau en réponse à l'agression UV sont en grande partie dépendantes de la pigmentation constitutive de la peau et permettent de classer les individus en différents phototypes (I le plus clair à V le plus foncé) (Brenner & Hearing, 2008).

Les radiations UV ont des effets néfastes sur la peau. Elles induisent des dommages à l'ADN que l'on qualifie donc de photo-induits, entraînant des mutations caractéristiques sur les gènes. L'eumélanine et la phéomélanine sont présentes dans l'épiderme, mais le ratio d'expression entre les deux varie. Plus le phototype de la peau est clair, plus la quantité d'eumélanine est basse. L'eumélanine possède un rôle photoprotecteur important (Brenner & Hearing, 2008). Ceci explique les différences de vulnérabilité face à l'exposition aux UV (Thody et al., 1991). De plus, toutes les zones de l'épiderme n'ont pas la même quantité de mélanocytes. Les mélanocytes sont plus abondants au niveau de la face, du scalp, des régions génitales et anales ou de la cavité orale et sont moins abondants sur la plante des pieds et la paume des mains.

La mélanine est produite dans des organites appelées mélanosomes (Lin & Fisher, 2007). Les mélanosomes sont transférés des mélanocytes vers les kératinocytes grâce à leurs prolongements dendritiques. Un mélanocyte fournit de la mélanine à environ 36 kératinocytes (Quevedo et al., 1975).

1.3.2 Les mélanocytes non cutanés

1.3.2.1 Les mélanocytes de l'oreille interne

Bien que n'ayant pas de rôle direct dans l'audition, les mélanocytes de l'oreille interne sont impliqués dans le développement de la cochlée et dans son fonctionnement normal. Les personnes atteintes du syndrome de Waardenburg, associé à un défaut de maturation des mélanocytes, ont une réduction des mélanocytes matures dans l'oreille interne. Les personnes atteintes de ce syndrome souffrent de surdité associée à des troubles de la pigmentation (Matsunaga et al., 2013). De plus, les mélanocytes de l'oreille protègent de l'exposition aux sons forts pouvant causer des dommages en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une étude réalisée sur une population d'adolescents suédois a montré que le niveau de pigmentation influence la sensibilité aux surdités temporaires induites par une exposition aux sons forts (Barrenäs & Lindgren, 1990). La perte de ces cellules peut également entraîner des surdités suite à un traumatisme ou une infection, par exemple (Tachibana, 1999).

1.3.2.2 Les mélanocytes présents au niveau du cerveau et du système nerveux

Les mélanocytes du cerveau proviennent de la portion céphalique de la crête neurale. Ils se situent au niveau des leptoméniges (Goldgeier et al., 1984 ; Gudjohnsen et al., 2015). Bien que plusieurs études aient démontré leur existence, le rôle de ces mélanocytes n'est pas clairement établi. Il semblerait qu'ils aient un rôle de détoxification, un éventuel rôle dans la régulation endocrinienne et qu'il existerait une certaine communication avec les neurones (Plonka et al., 2009 ; Yaar & Park, 2012). Il ne faut néanmoins pas confondre la mélanine produite par les mélanocytes cérébraux et la neuromélanine. Cette dernière est produite par le neurone dans la substance noire du cerveau. Cette substance possède également un rôle de détoxification (Zecca, Bellei et al., 2008 ; Zecca, Casella et al., 2008).

1.3.2.3 Les mélanocytes cardiaques et pulmonaires

Peu de choses sont connues concernant les mélanocytes présents dans le cœur et les poumons. De plus, les recherches permettant leur étude ont essentiellement été réalisées chez la souris. Ainsi, nous pouvons seulement supposer que ces observations soient également vraies chez l'homme. Des mélanocytes ont été retrouvés au niveau des valves cardiaques chez la souris. Dans cette région, les mélanocytes semblent garantir les propriétés viscoélastiques des valves, assurant ainsi leur bon fonctionnement (Balani et al., 2009). Il n'y a cependant pas de signe montrant que ces mélanocytes soient indispensables, ni même que leur nombre soit en corrélation avec la survie des souris (Yajima & Larue, 2008). Les mélanocytes cardiaques assurent également une protection contre les ROS (Dubey & Roulin, 2014). Les mélanocytes pulmonaires sont, quant à eux, encore moins bien caractérisés. Des cellules qualifiées de « mélanocytes-like » ont été identifiées. Ces cellules sont impliquées dans l'élasticité des tissus et régulent l'homéostasie du calcium ; elles semblent également avoir un rôle dans la détoxification de ces tissus (Levin, 2019).

1.3.2.4 Les mélanocytes du tissu adipeux

Des mélanocytes et de la mélanine ont également été observés dans les adipocytes. Les mélanocytes représentent une proportion infime de l'ensemble du tissu, d'autant plus chez les personnes non-obèses. En effet, les granules contenant de la mélanine sont majoritairement retrouvés chez les personnes obèses. Leur fonction n'est, à ce jour, pas élucidée. Ils pourraient être impliqués dans la protection contre le stress oxydatif, ainsi que contre les toxines (Randhawa et al., 2009).

1.3.2.5 Les mélanocytes uvéaux

Des mélanocytes sont aussi présents dans l'œil, plus précisément au niveau de l'uvée. L'uvée est une tunique centrale. Elle est entourée d'une tunique fibreuse externe, comprenant la sclère et la cornée, et d'une tunique interne neuroectodermique : la rétine. L'uvée est divisée en deux segments : une partie antérieure composée de l'iris

et des corps ciliaires et une partie postérieure, la choroïde (Miller, 2008) (Figure 26). Cette tunique centrale est l'une des deux sources de pigmentation de l'œil due à la présence des mélanocytes. La deuxième source de pigmentation est l'épithélium de la rétine (Lopes et al., 2007). La couleur des yeux est directement corrélée à la quantité et au type de mélanine (eumélanine ou phéomélanine) retrouvé au niveau de l'iris. Cette observation est en adéquation avec ce qui a été noté pour la couleur de la peau ; c'est-à-dire que plus la quantité d'eumélanine est importante, plus les yeux auront une couleur foncée. À l'inverse, les yeux les plus clairs sont caractérisés par une quantité de phéomélanine élevée (Wakamatsu et al., 2008). La mélanogenèse des mélanocytes uvéaux commence au cours de la 20^e semaine de développement embryonnaire pour s'achever quelques semaines, voire quelques mois après la naissance (Creuzet & Etchevers, 2017 ; Wade & Finger, 2001).

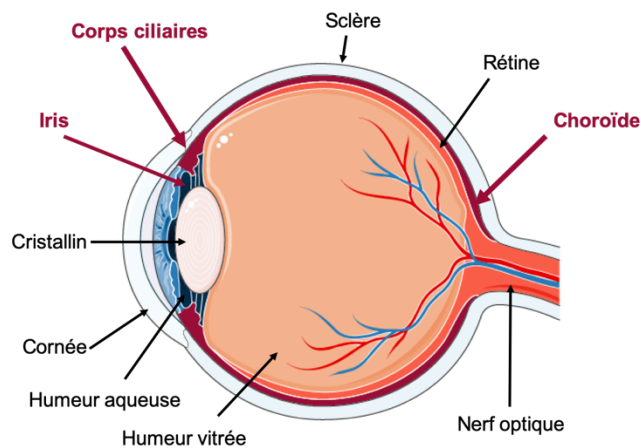


Figure 26 : Représentation schématique de l'œil (adaptée de Jager et al., 2020)

L'uvée, et plus particulièrement la choroïde, est une tunique vascularisée dont le rôle est d'apporter les nutriments nécessaires aux deux autres tuniques voisines avasculaires que sont la rétine et la sclère. Les corps ciliaires, en plus de contrôler le cristallin et de réguler la pression intraoculaire, produisent l'humeur aqueuse, riche en nutriments. L'iris contrôle la quantité de lumière qui entre dans l'œil. Le principal rôle de l'uvée est donc d'assurer l'apport de nutriments aux différentes structures oculaires (Miller, 2008). Cependant, le rôle des mélanocytes qui y sont localisés est moins clair. Contrairement aux mélanocytes cutanés qui transfèrent la mélanine produite aux

cellules voisines, les kératinocytes, les mélanocytes uvéaux ne transfèrent pas la mélanine qu'ils produisent (Hu, 2000).

Il a été supposé que les mélanocytes uvéaux puissent, à l'instar de leurs homologues cutanés, assurer une protection contre les UV. Les yeux sont, en effet, soumis à l'exposition aux UV. Ces derniers sont divisés en trois types : UV-A (λ ~320-380 nm), UV-B (λ : ~280-320 nm), UV-C (λ : ~100 à 280 nm). Les UV-C sont totalement absorbés par la couche d'ozone, à l'exception de certaines sources artificielles qui peuvent en produire. La cornée, partie la plus antérieure de l'œil, peut absorber les UV-C, une partie des UV-B et une faible proportion des UV-A. Ainsi, les mélanocytes de l'iris sont soumis à une partie du spectre des UV-A et UV-B, ainsi qu'à la lumière visible (λ : ~380 à 780 nm).

En revanche, la choroïde et les corps ciliaires sont recouverts par la rétine. À l'âge adulte, les propriétés du cristallin et de la cornée sont telles que seule la lumière visible atteint l'épithélium de la rétine. Les mélanocytes uvéaux ne semblent donc pas, à l'exception peut-être des mélanocytes de l'iris, jouer un rôle important dans la protection contre les UV (Hu, Simon, & Sarna, 2008 ; Sliney, 2002.). Toutefois, ils semblent avoir un rôle dans la protection contre le stress oxydatif. En effet, leurs interactions avec l'épithélium rétinien les rendent particulièrement sujets au stress oxydatif. Les mélanocytes uvéaux exerceraient donc un rôle anti-oxydant (Hong, Simon & Sarna, 2006).

2 Le mélanome uvéal

La transformation maligne des mélanocytes conduit à la formation d'un mélanome. Le plus fréquent, et donc le plus étudié, est le mélanome cutané. Les mélanocytes des corps ciliaires, de la choroïde et de l'iris peuvent conduire également à la formation d'un mélanome, tous trois regroupés sous le nom de mélanome uvéal. Ce cancer se développe donc à l'intérieur de l'œil entre la sclère et la rétine. Comme précédemment décrit, l'uvéa peut se diviser en deux parties : une antérieure (l'iris et les corps ciliaires) et une postérieure (la choroïde). Pour le mélanome uvéal, on distingue donc le mélanome uvéal antérieur et le mélanome uvéal postérieur (voir Figure 27).

Bien qu'ils partagent une origine commune qu'est le mélanocyte, les mélanomes cutanés et uvéaux sont deux cancers bien différents qui partagent peu de caractéristiques moléculaires (Rodrigues et al., 2019).

2.1 Épidémiologie des mélanomes uvéaux

Avec 500 à 600 nouveaux cas par an en France, selon l'Institut Curie¹, et entre 6 700 et 7 100 patients nouvellement diagnostiqués dans le monde chaque année, le mélanome uvéal ne représente que 3,8 % de l'ensemble des mélanomes. Cette incidence le classe donc parmi les maladies rares. Cependant, il est le cancer intraoculaire primitif le plus fréquent chez l'adulte. Dans la très grande majorité des cas, la maladie ne se développe que dans un seul œil. L'âge moyen au diagnostic se situe autour de 60 ans (Mahendraraj et al., 2016).

Si nous considérons la population mondiale, ce cancer concerne entre < 1 et 10 cas par million d'habitants au cours des dernières décennies. Les incidences les plus élevées (> 8) sont rencontrées dans les régions d'Europe du Nord, d'Australie et de Nouvelle-Zélande. À l'inverse, l'incidence est extrêmement faible (< 1) au Japon et en Afrique. Contrairement au mélanome cutané, l'incidence de ce cancer est relativement stable au cours du temps. La grande majorité de ces mélanomes correspondent à des mélanomes choréïdiens qui représentent 90 % des mélanomes uvéaux. Parmi ceux-ci, 6 % et 4 % sont respectivement des mélanomes des corps ciliaires et de l'iris (Aronow et al., 2018 ; Bott et al., 2017 ; Jager et al., 2020 ; McLaughlin et al., 2005 ; Singh & Topham, 2003).

¹ <https://institut-curie.org/dossier-pedagogique/uveal-melanoma> Consulté en mai 2020.

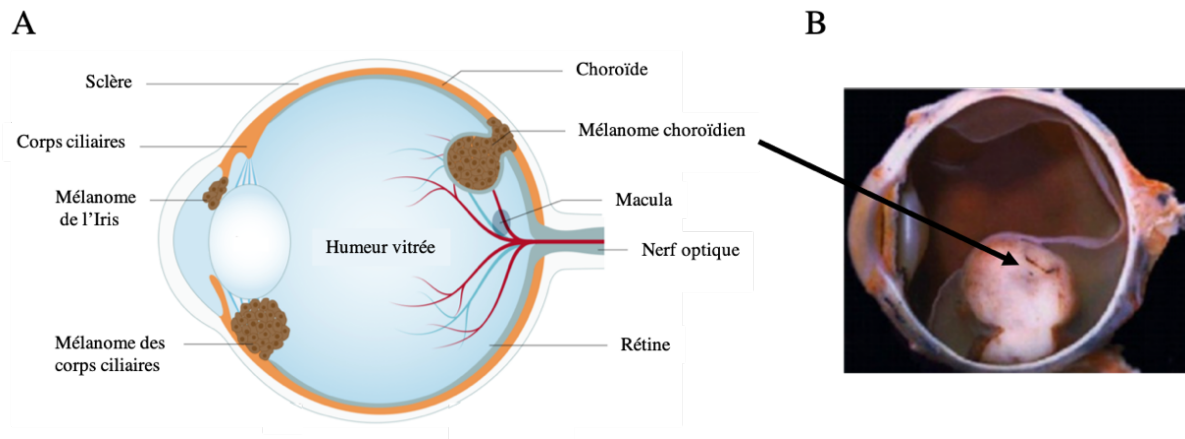


Figure 27 : Anatomie de l'œil. A : Schéma de l'anatomie de l'œil montrant les trois localisations possibles du mélanome uvéal (adapté de Jager et al., 2020) ; B : Photo d'un mélanome choroïdien (de David H. Abramson, M.D. Source : <https://www.eyeworld.org/>)

2.1.1 Les facteurs de risques

2.1.1.1 L'influence du phototype

Les principaux facteurs de risque sont la couleur de peau et les yeux clairs, comme pour le mélanome cutané (Weis et al., 2006). Ceci explique les différences géographiques observées concernant l'incidence de la maladie. Cependant, à l'inverse du mélanome cutané, l'exposition aux rayonnements UV n'est pas impliquée dans la survenue du mélanome postérieur. En effet, la charge mutationnelle de ce cancer est très faible et les mutations retrouvées ne correspondent pas aux mutations caractéristiques de la signature UV (Royer-Bertrand et al., 2016). Seuls les mélanomes de l'iris peuvent être induits par les UV. Ils sont donc légèrement différents des mélanomes postérieurs de l'uvée (Jager et al., 2020).

2.1.1.2 L'impact environnemental

L'exposition à des produits toxiques, tels que l'amiante, peut être impliquée dans la survenue des mutations germinales de *BRCA1 associated protein-1 (BAP1)*, mutations caractéristiques des mélanomes uvéaux.

2.1.1.3 La présence d'un nævus bénin

Les nævi uvéaux sont les lésions bénignes les plus fréquentes. Une étude américaine, ayant pour objectif d'étudier la prévalence de cette lésion sans distinction de groupes ethniques, estime qu'elle survient chez 5 % de la population américaine (Chien et al., 2017). Des mutations des gènes *G protein subunit alpha q (GNAQ)* et *G protein subunit alpha 11 (GNA11)* ont été retrouvées dans ces nævi. Il s'agit des mutations les plus fréquemment rencontrées dans les mélanomes uvéaux. Pour autant, seule une faible proportion des nævi se transforme en mélanome. Le risque augmente avec la taille du nævus (Vader et al., 2017). De façon intéressante, la même observation peut être faite avec les nævi cutanés bénins et les mélanomes cutanés. Environ la moitié des mélanomes cutanés présentent des mutations sur le gène *BRAF*. Cette mutation est souvent retrouvée dans les nævi bénins (Pollock et al., 2003 ; Shain et al., 2015).

2.1.1.4 Les prédispositions génétiques

Des familles ont été décrites comme présentant plusieurs cas de mélanomes uvéaux. Considérant la faible fréquence de cette maladie, plusieurs cas dans une même famille évoquent une prédisposition génétique. Une mutation germinale de *BAP1* a été retrouvée dans plusieurs familles (Abdel-Rahman et al., 2011).

Le syndrome de prédisposition lié à *BAP1* est associé à une augmentation du risque de présenter certains types de cancer, dont le mélanome uvéal. Il s'agit d'un syndrome autosomique dominant héréditaire (Abdel-Rahman et al., 2011 ; Carbone et al., 2012). Une mutation germinale de *BAP1* est retrouvée dans environ 4 % des mélanomes uvéaux (Aoude et al., 2013 ; Sunness et al., 2020).

2.2 Génétique des mélanomes uvéaux

L'étude de la génétique du mélanome uvéal révèle un faible taux de variation du nombre de copies (CNV) et de mutations d'un seul nucléotide (SNV) dans les régions codantes, comparativement aux autres tumeurs. En effet, le taux de mutations retrouvées dans les régions codantes est le plus bas lorsque l'on compare le mélanome

uvéal avec le mélanome cutané, acral et mucosal. Les mélanomes cutanés sont des tumeurs à haut taux de mutations. Le nombre médian de mutations pour un exome de patient atteint de mélanome cutané est compris entre 17 et 21 par mégabase. Ce fort taux de mutations est notamment dû à l'exposition aux UV, les tumeurs qui ont été fortement exposées présentent généralement plus de 20 mutations par mégabase (Akbari et al., 2015 ; Hayward et al., 2017 ; Rajkumar & Watson, 2016). Le taux de mutation des mélanomes uvéaux est de 1,1 mutation par mégabase (Robertson et al., 2018). Il est donc plus proche de celui des tumeurs pédiatriques que des cancers de l'adulte. Ces derniers sont souvent caractérisés par une accumulation de mutations, ce qui se traduit par une plus forte hétérogénéité. À l'inverse, les tumeurs de l'enfant se sont développées sur une période plus courte et sont donc souvent moins hétérogènes (Figure 28) (Royer-Bertrand et al., 2016).

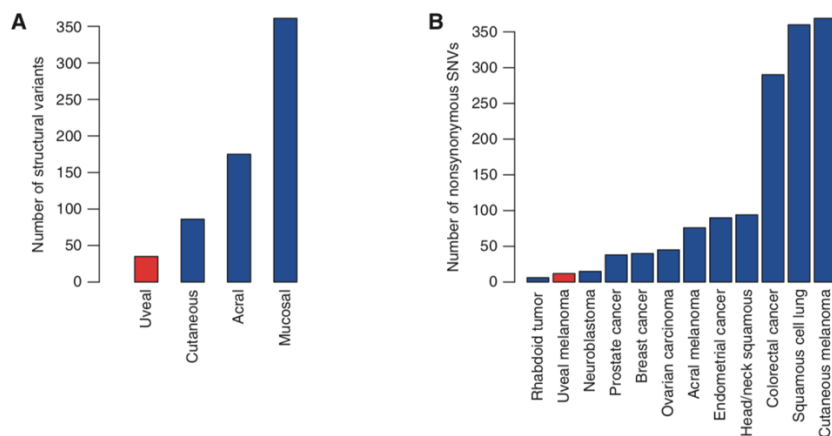


Figure 28 : Profil de mutation du mélanome uvéal. (A) : Nombre de variants structuraux dans les quatre types de mélanomes. (B) Nombre de mutations non synonymes pour le mélanome uvéal comparé à d'autres types de tumeurs (d'après Furney et al., 2013).

2.2.1 Altérations chromosomiques

Des altérations chromosomiques sont remarquées de manière récurrente dans les tumeurs uvéales. Parmi elles, on trouve plus fréquemment la monosomie du chromosome 3 et le gain du bras long du chromosome 8 (8q). Moins fréquemment, d'autres altérations du nombre de copies ont été identifiées : perte du 1p, gain du 1q, gain du 6p, perte du 6q, gain du 8q. La détection de cette altération est très importante

pour les cliniciens comme pour les patients, car elle permet d'établir un pronostic (Aalto et al., 2001).

2.2.2 Mutations

Certaines mutations sont très fréquemment retrouvées et sont caractéristiques des tumeurs uvéales. Il s'agit, d'une part, des mutations de gènes qui appartiennent à la voie de signalisation des protéines $G\alpha$: gènes *GNAQ*, *GNA11*, *Phospholipase C Beta 4 (PLCB4)*, *Cysteinyl Leukotriene Receptor 2 (CYSLTR2)*, lesquelles sont, à l'exception de quelques rares cas, mutuellement exclusives. D'autre part, les mutations de *BAP1*, *Eukaryotic translation initiation factor 1A*, *X-chromosomal (EIF1AX)*, *Splicing Factor 3b Subunit 1 (SF3B1)* et *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2 (SRSF2)* sont également retrouvées dans de nombreux cas (Robertson et al., 2017).

2.2.2.1 Mutations de la voie de signalisation des protéines $G\alpha$

Les protéines G sont des GTPase, c'est-à-dire des protéines liant le GTP ou le GDP selon qu'elles sont respectivement sous forme active ou inactive. Elles ont pour fonction l'hydrolyse du GTP en GDP. Ces protéines G forment un complexe hétérotrimérique de trois sous-unités α , β et γ . Celles-ci sont impliquées dans la transduction du signal des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces derniers sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation. En effet, ils lient de nombreux ligands comme des hormones, des nucléotides ou des lipides. Il existe environ 17 isoformes de la sous-unité G, réparties en 4 familles (α_s ; α_i ; α_q et α_{12}) en fonction de leur homologie et de leur rôle dans la signalisation cellulaire (Figure 29). Dans la famille α_q , on rencontre notamment $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ codés par les gènes *GNAQ* et *GNA11* respectivement. La famille α_q active la voie de signalisation de la phospholipase $C\beta$ (PLC) (Kamoto et al., 2017 ; Weinberg, 2013). *GNAQ* et *GNA11* présentent une très grande homologie (> 80 %) (Syrovatkina et al., 2016).

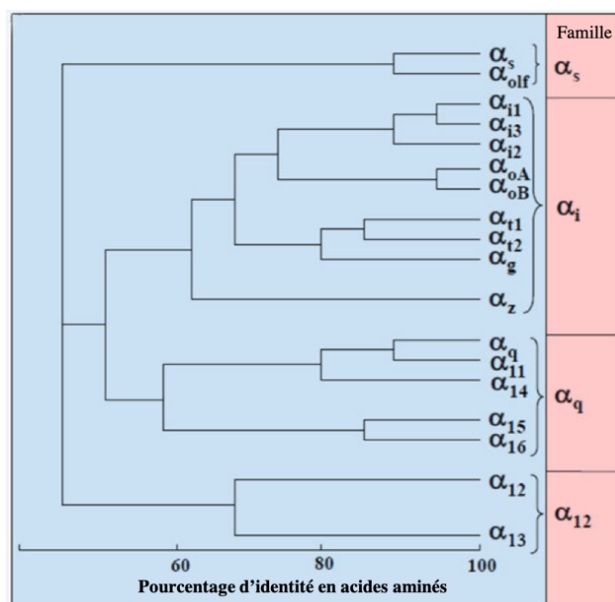


Figure 29 : Les protéines $G\alpha$ sont divisées en 4 familles : α_s , α_i , α_q et α_{12} . Les Protéines $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ appartiennent à la famille $G\alpha_q$. (Adaptée de Sirovatkina et al., 2017)

Les mutations de *GNAQ* et *GNA11* ont été identifiées de façon récurrente dans les mélanomes uvéaux par Van Raamsdonk et collaborateurs. Ces mutations sont mutuellement exclusives et concernent plus de 80 % des mélanomes uvéaux. Les mutations affectent les positions Q209 dans la majorité des cas (~ 95 %), mais aussi R183 (~ 5 %) sur l'un ou l'autre des gènes (Van Raamsdonk et al., 2009, 2010). Ces mutations, en réduisant l'activité GTPase intrinsèque, favorisent la transduction du signal et l'activation des voies de signalisation en aval (Amaro et al., 2017 ; Shoushtari & Carvajal, 2014).

Dans les mélanomes pour lesquels les gènes *GNAQ* et *GNA11* ne sont pas mutés, deux autres mutations mutuellement exclusives ont été identifiées. Il s'agit des mutations de *PLCB4* et de *CYSLTR2*. *PLCB4* code l'isoforme 4 de la phospholipase C- β , qui est directement en aval de la protéine $G\alpha_q$. Un site est retrouvé préférentiellement muté : il s'agit de la position D630. La mutation gain de fonction de *PLCB4* en position D630 conduit à une surexpression de la voie de signalisation en aval (Johansson et al., 2016). *CYSLTR2* code le RCPG CysLTR2 qui est également associé aux protéines $G\alpha_q$. La mutation de ce dernier, principalement L129Q, entraîne une activation constitutive de ce récepteur, activant *de facto* les voies de signalisation en aval (Moore et al., 2016).

Bien que l'évènement initiateur de la tumorigenèse des mélanomes uvéaux n'est pas établi de façon certaine, les mutations de *GNAQ*, *GNA11*, *PLCB4* et *CYSLTR2*, mutuellement exclusives, sont décrites comme des mutations dites « drivers » des mélanomes uvéaux. Ceci est entre autres soutenu par le fait que les mutations de *GNAQ* et *GNA11* ont été retrouvées dans des lésions pré- et non-néoplasiques comme le nævus bleu, le nævus de Ota et celui de Ito (Tse et al., 2016 ; Van Raamsdonk et al., 2009). *CYSLTR2* muté est également retrouvé dans le nævus bleu (Figure 30) (Möller et al., 2017).

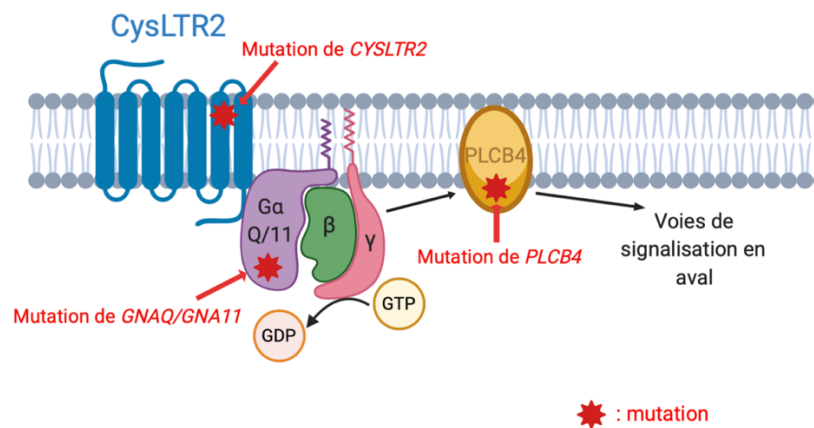


Figure 30 : Représentation schématique des mutations drivers du mélanome uvéal (adaptée de Moore et al., 2016)

2.2.2.2 Second évènement mutationnel

Considérant les mutations de la voie des protéines G comme le premier évènement génétique, plusieurs mutations ont été retrouvées dans les mélanomes uvéaux et considérées comme second évènement. Il s'agit de l'ensemble des mutations de *BAP1*, *EIF1AX*, ainsi que de *SF3B1*, appelé évènement « BES ». Leur implication dans la tumorigenèse n'est pas encore bien décrite (Decatur et al., 2016 ; Robertson et al., 2017).

2.2.2.2.1 Mutation de *BAP1*

BAP1 dont le locus est situé sur le bras court du chromosome 3 (3p21) est fréquemment muté dans les mélanomes métastatiques (Harbour et al., 2010).

Une inactivation bi-allélique de *BAP1* est retrouvée dans environ 50 % des cas. Elle est associée à une monosomie du chromosome 3 et une inactivation de l'autre allèle. *BAP1* est une protéine nucléaire avec de très nombreuses fonctions dans la cellule. Elle assure la déubiquitination de protéines. Elle est aussi impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, de la croissance cellulaire, dans l'apoptose, ainsi que dans la réparation des dommages à l'ADN, et le remodelage de la chromatine. La perte de *BAP1* est associée à des modifications de la méthylation de l'ADN (Field et al., 2019 ; Jager et al., 2020). *BAP1* semble avoir des rôles antagonistes en fonction de la lignée cellulaire : suppresseur de tumeurs ou promoteur de la prolifération cellulaire (Eletr & Wilkinson, 2011 ; Ventii et al., 2008). *BAP1* a initialement été décrite comme étant impliquée dans les réparations des dommages à l'ADN, étant une déubiquitinase qui contrôle BRCA1 (Jensen et al., 1998). *BAP1* est donc impliquée, comme c'est le cas pour BRCA1, au niveau des cassures double brin de l'ADN (Yu et al., 2014). Cependant, les mélanomes uvéaux mutés *BAP1* ne présentent pas d'instabilité génomique. De nombreuses autres fonctions ont été attribuées à *BAP1* sans pour autant pouvoir les relier et expliquer son rôle dans la tumorigenèse des mélanomes uvéaux (Masoomian et al., 2018).

Initialement décrite chez la drosophile, *BAP1* a également un rôle dans la régulation épigénétique. Elle s'associe également avec certaines isoformes d'Additional sex combs-like (ASXL) qui est une protéine dite d'échafaudage pour des régulateurs épigénétiques et facteurs de transcription. *BAP1* fait aussi partie du complexe Polycomb, impliqué dans la répression transcriptionnelle (Wang et al., 2018).

2.2.2.2.2 Mutation de *SF3B1*

Des facteurs d'épissage font également partie des gènes fréquemment mutés dans le mélanome uvéal. La mutation de *Splicing Factor 3b Subunit 1* (*SF3B1*), mutuellement exclusive des mutations de *BAP1* et *EIF1AX*, est associée à des

mélanomes à faible risque métastatique. Elle est retrouvée dans environ 25 % des mélanomes uvéaux (Furney et al., 2013 ; Martin et al., 2013). *SF3B1* code la sous-unité 1 du facteur d'épissage 3B, faisant partie du complexe nucléaire ribonucléoprotéique U2 du spliceosome. Ce facteur interagit avec l'intron au niveau du site de branchement, ce qui entraîne le recrutement du complexe U2. Les mutations de *SF3B1* sont retrouvées majoritairement en position R625, K666 et K700, dans le mélanome uvéal et perturbent sa fonction (Furney et al., 2013 ; Harbour et al., 2013). En effet, elles entraînent la reconnaissance d'un site accepteur alternatif qui provoque une rétention d'une petite partie de l'intron (Furney et al., 2013). Cet épissage anormal conduit à la production de transcrits et donc de protéines atypiques. Les jonctions d'épissage sont concernées à la hauteur d'environ 1 %. Leur rôle dans le processus tumoral n'est pas établi (Alsafadi et al., 2016). Récemment, un épissage anormal de Bromodomain Containing 9 (BRD9), impliqué dans le remodelage de la chromatine, a été mis en évidence dans les cas de mélanomes uvéaux mutés *SF3B1*. Cette dérégulation pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeurs dans ces cas de mélanomes uvéaux (Inoue et al., 2019). *SF3B1* n'est pas le seul facteur d'épissage retrouvé muté. Des mutations d'autres facteurs d'épissage tels que *RNA Binding Motif Protein 10 (RBM10)*, *SRSF2*, *Splicing Factor 3a Subunit 1 (SF3A1)* et *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 7 (SRSF7)* ont été décrites, mais dans des cas beaucoup plus rares (3 %, 2 %, 1 % et 1 % respectivement) (Field et al., 2018 ; Robertson et al., 2017).

2.2.2.2.3 Mutation d'*EIF1AX*

Parmi les gènes fréquemment mutés dans le mélanome uvéal, *Eukaryotic translation initiation factor 1A (EIF1AX)* a été mis en évidence. Il est retrouvé muté dans environ 15 % des mélanomes uvéaux. Ce gène code eIF1A, composant du complexe de pré-initiation de la traduction. Ce complexe recrute la petite sous-unité du ribosome au niveau de la coiffe en 5' des ARNm pour initier la traduction. Ces mutations sont principalement retrouvées sur les exons 1 et 2 sans qu'il y ait de position récurrente précise. Elles affectent la partie N terminale de la protéine *EIF1AX* (Martin et al., 2013). Les voies de signalisation en aval ne sont pas encore connues (Jager et al., 2020 ; Martin et al., 2013).

2.2.3 Les voies de signalisation impliquées dans le mélanome uvéal

2.2.3.1 Voie de signalisation Phospholipase C et MAPK

Les mutations des protéines G ont, dans un premier temps, été décrites comme activant la voie des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) par l'intermédiaire de la phospholipase C.

Plus précisément, l'activation de la phospholipase C par les protéines G entraîne le clivage du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). L'IP3 entraîne une élévation du taux de calcium (Ca^{2+}) ; ce qui, en association avec le DAG, active notamment la protéine kinase (PKC). S'ensuivent les phosphorylations en cascade de Raf, MEK1/2 et enfin Extracellular signal-regulated kinases (ERK). Une fois transloquée dans le noyau, ERK favorise la prolifération et la différenciation cellulaire (Figure 31) (Wu 1992 ; Griner et al., 2007; Krantz et al., 2017).

Les mutations observées dans le mélanome uvéal conduisent à une activation de cette voie, mais pas suffisamment pour expliquer la croissance tumorale (Mouti et al., 2016 ; Van Raamsdonk et al., 2009). Cette observation est cohérente avec le fait que les thérapies utilisant les inhibiteurs spécifiques de la voie MEK/ERK ont donné des résultats décevants (Jager et al., 2020).

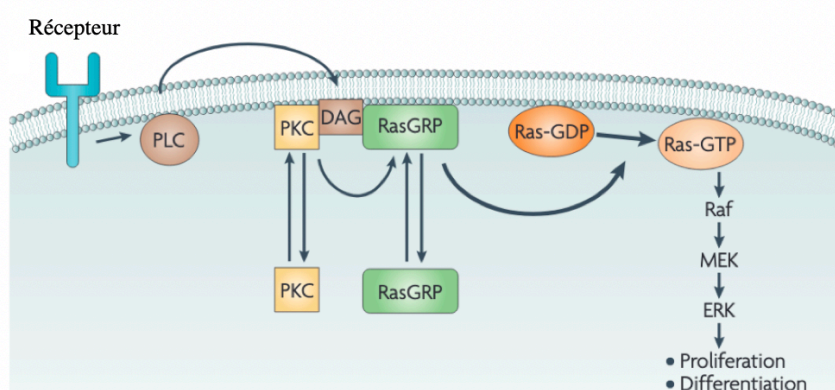


Figure 31 : Cascade d'activation de la voie de signalisation MEK/ERK, PLC : phospholipase C, DAG : Diacylglycérol, PKC : protéine kinase C, RasGRP RAS guanyl nucleotide-releasing protein ; (adaptée de Griner & Kazanietz, 2007)

2.2.3.2 Voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR

En parallèle de la voie des MAPK, la voie PI3K-AKT- *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) est activée de façon constitutive dans les mélanomes uvéaux. L'activation de phosphoinositide 3-kinase (PI3K) conduit à la production d'inositol 3,4,5-triphosphate qui active Akt, qui active à son tour mTOR. Cependant, cette suractivation ne semble pas expliquer à elle seule la croissance tumorale (Babchia et al., 2010 ; Krantz et al., 2017 ; Pópulo et al., 2010 ; Ye et al., 2008).

2.2.3.3 Voie de signalisation YAP

Plus récemment, les mutations de la voie $G\alpha q$ ont été décrites comme activant *Yes associated protein* (YAP). YAP est un co-activateur transcriptionnel de la voie Hippo et est principalement décrit pour contrôler la taille des organes chez les mammifères. Cette voie de signalisation s'active de la façon suivante : MST1/2 (qui est l'homologue humain d'Hippo, identifiée chez la drosophile) phosphoryle *Large tumor suppressor kinase 1/2* (LATS1/2) qui, à son tour, phosphoryle et inactive YAP, ainsi que son co-activateur TAZ pour limiter son activité. La phosphorylation de YAP entraîne sa reconnaissance par la protéine 14-3-3, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. De son côté, YAP déphosphorylée est transloquée dans le noyau actif (Pan, 2010).

Cependant, les mutations activatrices $G\alpha q$ n'entraînent pas l'activation de YAP par la voie canonique, mais par une voie hippo-indépendante. Cette activation est également indépendante de celle de la PLC.

$G\alpha q$ muté active la *guanine exchange factor* (GEF) : Trio et ses co-activateurs RhoA et Rac1. RhoA et Rac1 activés conduisent à la polymérisation et à l'accumulation de l'actine. L'actine sous cette forme est appelée actine-F.

AMOT séquestre YAP dans le cytoplasme en formant un complexe qui le protège de l'inhibition par LATS1/2. L'actine-F peut se lier à AMOT et déplacer YAP qui peut être transloqué dans le noyau et être actif ou alors réintégrer la voie Hippo et être phosphorylé par LATS1/2 induisant sa dégradation. YAP nucléaire se lie à des facteurs de transcription comme Transcriptional enhancer factor TEF-1 (TEAD) ou

SMAD, activant la transcription de nombreux gènes. AMOT a donc un rôle ambigu dans cette voie. À la fois, il protège YAP de la dégradation par le protéasome et, en même temps, il le séquestre dans le noyau l'empêchant d'être actif.

Le rôle de RhoA et Rac1 sur LAPS1/2 n'est actuellement pas décrit ; cependant, il semblerait que, dans le contexte des mutations Gαq dans le mélanome uvéal, ils inhiberaient l'activité de LATS1/2 (Figure 32) (Feng et al., 2014 ; Yu et al., 2014).

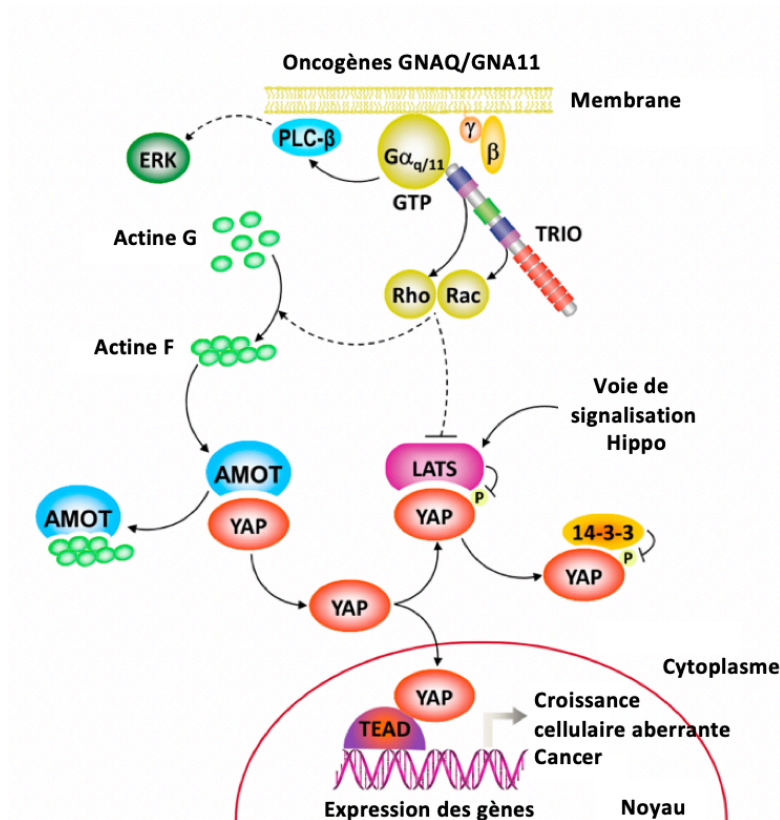


Figure 32 : Représentation schématique de l'activation de YAP par les mutations de GNAQ/GNA11 (adaptée de Feng et al., 2014)

Une récente étude montre que malgré l'activation de cette voie dans les mélanomes uvéaux, il n'est pas possible de corrélérer l'activité de YAP avec la survie des patients (Kim et al., 2020). Actuellement, il n'y a pas d'explication à ce résultat surprenant. Nous pouvons seulement émettre des hypothèses. La mélanogénèse des mélanomes uvéaux est peut-être dépendante de la combinaison d'activation de ces différentes voies, il faut peut-être les considérer dans leur ensemble et non séparément.

2.2.3.4 Implication de plusieurs voies de signalisation

La protéine ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) est en aval dans la voie de signalisation des $G\alpha_q$. Cette protéine active plusieurs voies de signalisation en aval, dont celle des MAPK, β -caténine et également la voie YAP.

La voie des $G\alpha_q$ est sur-activée dans la quasi-totalité des mélanomes uvéaux. Il semble évident que plusieurs voies en aval soient activées. Cependant, leur implication respective n'est pas encore claire (Jager et al., 2020).

2.3 Diagnostic, pronostic et évolution métastatique

2.3.1 Diagnostic

La survenue d'une tumeur au niveau de l'uvée peut engendrer différents symptômes comme l'altération de la vision et/ou entraîner l'apparition d'une douleur au niveau de l'œil ou encore un décollement de la rétine. Cependant, dans environ 30 % des cas, la maladie est asymptomatique et le diagnostic se fait fortuitement lors d'un examen ophtalmologique de contrôle (Jager et al., 2020). L'anatomie et la localisation de la tumeur sont les premiers critères qui permettent de déterminer le pronostic lors du diagnostic. L'épaisseur de la tumeur, la présence de pigments oranges et le diamètre supérieur à 3 mm sont, entre autres, des critères à considérer pour évaluer le pronostic (Krantz et al., 2017). L'implication des corps ciliaires, ainsi que l'étendue extra-oculaire influencent négativement le pronostic (Kaliki et al., 2015 ; Rishi et al., 2015).

2.3.2 L'évolution métastatique conditionne le pronostic

Les traitements du mélanome uvéal sont efficaces lors des premiers stades de la maladie, c'est-à-dire lorsque la tumeur est localisée seulement au niveau de l'œil. Cependant, environ un tiers des patients développent des métastases qui ne seront détectées, dans certains cas, que très longtemps après le diagnostic initial du mélanome.

En effet, elles peuvent être découvertes entre 10 et 35 ans plus tard. La mortalité à 5 ans est de 30 % et à 15 ans de 45 %. Toutefois, la médiane de survie des patients atteints de mélanome métastatique est de l'ordre d'une année. Et seulement, environ 8 % des patients survivraient au-delà de deux années (M. Buzzacco, 2012 ; Rietschel et al., 2005 ; Willson et al., 2001). Le pronostic est donc bien corrélé au risque métastatique.

Des critères cytogénétiques peuvent aussi être utilisés pour prédire le risque de survenue des métastases et donc le pronostic. L'étude des chromosomes 3 et 8 est déterminante. Une monosomie du chromosome 3, ainsi qu'un gain du bras long du chromosome 8 sont utilisés pour déterminer prédire le pronostic des patients (Horsman & White, 1993 ; Sisley et al., 1997). L'association de ces deux événements signe les mélanomes avec le plus mauvais pronostic. En se basant uniquement sur l'analyse de ces deux chromosomes, il est possible de distinguer trois groupes de patients (Cassoux et al., 2014) :

- Patients à haut risque : monosomie du chromosome 3 **et** gain du 8q.
- Patients à risque intermédiaire : monosomie du chromosome 3 **ou** gain du 8q.
- Patients à faible risque : aucune de ces deux altérations.

Le lien entre ces altérations chromosomiques, l'agressivité de la tumeur, et donc le pronostic, n'est pas clairement établi. Néanmoins, des éléments de réponse peuvent être apportés lorsqu'on étudie les gènes dont le locus se situe sur ces régions. Par exemple, *BAP1*, suppresseur de tumeurs et fortement impliqué dans la biologie des mélanomes uvéaux, se situe sur le chromosome 3.

Par ailleurs, d'autres anomalies chromosomiques ont été décrites. Des pertes du bras court du chromosome 1 (1p) ou du bras long du chromosome 6 (6q) ont été associées à de plus mauvais pronostics, mais un gain du bras court du chromosome 6 6p est associé à un meilleur pronostic (Aalto et al., 2001 ; White et al., 1998).

Ces marqueurs cytogénétiques sont à combiner avec les critères moléculaires afin d'obtenir un meilleur pronostic (Kaliki et al., 2015). Alors que les mutations de la voie

Gαq ne paraissent pas influencer le pronostic, les mutations de BAP1 sont associées à un pronostic plus mauvais que les mutations de *SF3B1* et *EIF1AX*.

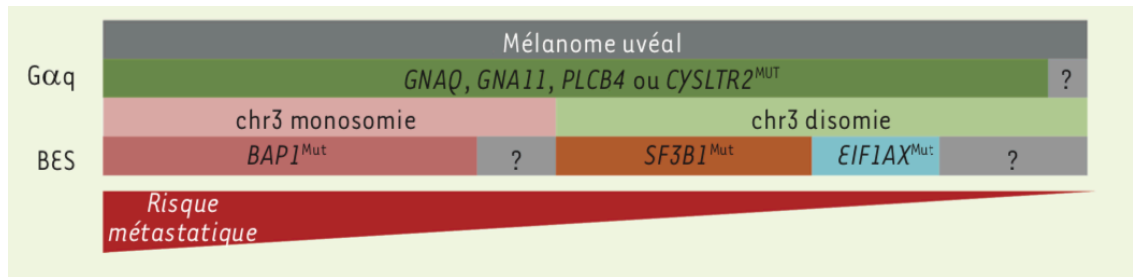


Figure 33 : Risque métastatique en fonction des mutations (adaptée de Alsafadi et al., 2018)

Le mélanome uvéal est un cancer à fort risque métastatique. Les métastases se localisent, dans environ 90 % des cas, au niveau du foie. Néanmoins, elles peuvent également être retrouvées dans d'autres parties du corps, dont les os et les poumons (Rietschel et al., 2005 ; Willson et al., 2001).

2.4 Traitements

Les traitements du mélanome uvéal dépendent du stade de la tumeur, qu'elle soit primaire ou métastatique.

2.4.1 Les tumeurs primaires

Les traitements des tumeurs primaires sont très efficaces. En effet, le taux de rechute à 10 ans est de l'ordre de 10 %. Le traitement dépend principalement de la localisation et de la taille de la tumeur. Les caractéristiques du patient, comme son âge et sa condition physique, et également ses préférences quand cela est possible, sont aussi prises en compte.

Les petites lésions antérieures accessibles sont le plus souvent traitées par curiethérapie. Il s'agit d'une forme de radiothérapie qui utilise une source de radioactivité (plaque en or dans laquelle est incorporée des grains d'iode 125) mise à proximité de la tumeur. Les petites tumeurs postérieures, sont traitées soit par

curiethérapies soit par protonthérapie. Cette dernière correspond à un à une forme de radiothérapie qui utilise un faisceau de proton. Les plus grosses tumeurs sont traitées par chirurgies. La conservation de l'œil n'est possible que pour certaines tumeurs. Très souvent la chirurgie consiste en une ablation de l'œil appelée énucléation. Il n'a pas été montré de différence significative de survie des patients dépendante du mode de traitement. (Gallie et al., 2016 ; Yang et al., 2018).

2.4.2 Les tumeurs métastatiques

Aucun traitement n'est efficace lorsque le mélanome uvéal atteint le stade métastatique. Seuls des traitements symptomatiques ou l'inclusion dans des essais cliniques peuvent être proposés aux patients (Jager et al., 2020).

2.4.2.1 Traitement localisé des métastases hépatiques

Le foie étant le principal site d'émergence de métastases, des traitements hépatiques peuvent être proposés. Par exemple, une résection chirurgicale des métastases peut être proposée selon l'avancée de la maladie, ce qui semble prolonger la survie des patients (Mariani et al., 2009). Des essais cliniques évaluent également la chimio-embolisation par l'artère hépatique pour traiter spécifiquement les métastases hépatiques (Bedikian et al., 1995 ; Leyvraz et al., 2014).

2.4.2.2 Traitement du mélanome uvéal par des agents cytotoxiques

Les agents cytotoxiques montrent une faible efficacité dans le traitement des mélanomes uvéaux. Plusieurs essais ont testé l'effet des agents alkylants comme la dacarbazine, le temozolomide, le cisplatine ou la fotémustine, mais les résultats se sont montrés décevants, entraînant une faible augmentation de la survie sans rechute. Les mélanomes uvéaux semblent malheureusement résistants aux traitements cytotoxiques classiquement utilisés (Buder et al., 2013).

2.4.2.3 Thérapies ciblées

L'avènement des thérapies ciblées (d'inhibiteurs de BRAF – BRAFi –) dans le traitement des mélanomes cutanés a révolutionné la prise en charge thérapeutique. La mutation *BRAF* V600E est retrouvée chez environ 50 % des patients atteints de mélanomes cutanés (Akbari et al., 2015). Cette mutation conduit à une activation constitutive de la protéine BRAF et donc de la voie des MAPK (Bollag et al., 2012). Les BRAFi sont spécifiques de cette mutation (Zaman et al., 2019). Dans le traitement des mélanomes cutanés métastatiques, ils sont associés à des inhibiteurs de MEK pour éviter des phénomènes de réactivation de la voie (Dréno et al., 2017). La mutation *BRAF* V600 n'est pas retrouvée dans les mélanomes uvéaux. De ce fait, les BRAFi ne peuvent être efficaces. *GNAQ* et *GNA11* sont mutés dans la grande majorité des mélanomes uvéaux. Ils constituent donc des cibles thérapeutiques prometteuses. Cependant, les molécules actuellement à l'étude sont efficaces à la fois sur la forme mutée et sur la forme sauvage, et sont donc toxiques (Jager et al., 2020 ; Lapadula et al., 2019 ; Yasui et al., 2008). Les mutations de la voie Gαq activent la voie des MAPK. Ainsi, des inhibiteurs de cette voie ont fait l'objet d'études dans le traitement des mélanomes uvéaux métastatiques. Bien que prometteurs dans les premières phases des tests, ils n'ont pas montré de réelles améliorations de la survie globale des patients (Scheulen et al., 2017). D'autres nombreux essais sont à l'étude ; mais, pour l'instant, aucun ne semble vraiment prometteur. Ces essais sont listés dans une revue récemment publiée par Jager et ses collaborateurs (Jager et al., 2020)

L'identification de la voie YAP/TAZ comme étant particulièrement active par les mutations Gαq en fait une bonne candidate pour le développement d'inhibiteurs spécifiques (Field & Harbour, 2014 ; Lyubasyuk et al., 2015). La vertéporfine est un inhibiteur spécifique de YAP et agit en perturbant son interaction avec ses cofacteurs. Elle est approuvée par l'agence américaine : la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des vaisseaux anormaux dans l'œil. La vertéporfine est efficace pour réduire la croissance cellulaire à la fois *in vitro* sur des cellules de mélanome uvéal et *in vivo* chez des souris xénotransplantées (Lyubasyuk et al., 2015 ; Yu et al., 2014).

2.4.2.4 Immunothérapies

L'immunothérapie est une stratégie thérapeutique efficace pour de nombreux patients atteints de mélanome cutané. Plusieurs protocoles d'immunothérapie ont fait l'objet d'essais cliniques pour le traitement des mélanomes uvéaux. Contrairement aux patients atteints de mélanome cutané, les patients atteints d'un mélanome uvéal répondent très peu, sinon pas (Schank & Hassel, 2019).

L'interféron α -2b associé ou non à l'interleukine 2 a montré un taux de réponse compris entre 0 et 20 % (Kivelä et al., 2003).

Plus récemment, les inhibiteurs de checkpoints ont été envisagés pour le traitement du mélanome uvéal. L'ipilimumab (inhibiteur de cytotoxique T lymphocyte antigen 4) a été testé. Malheureusement, le taux de réponse reste très faible n'excédant pas les 5 % (Luke et al., 2013).

L'autre classe de traitements couramment utilisée pour le traitement du mélanome cutané regroupe les inhibiteurs de PD-1. Bien qu'efficaces dans le traitement de ce type de mélanome, ils n'ont pas montré de meilleures réponses (~ 5 %) que les inhibiteurs de cytotoxique T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) (Algazi et al., 2016).

Ces études montrent donc que le mélanome uvéal présente une forte résistance aux immunothérapies, notamment à cause de leur faible charge mutationnelle. Cependant, de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le domaine de l'immunothérapie ont récemment montré leur efficacité pour le traitement de certains cancers et sont à l'étude pour le mélanome uvéal. Il s'agit notamment des cellules *Chimeric Antigen Receptor* CAR-T. Cette thérapie consiste à prélever les cellules T du patient, puis à les modifier pour qu'elles reconnaissent, grâce à un antigène spécifique, les cellules tumorales. Cette thérapie se montre très efficace dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant (Maude et al., 2018). Cette stratégie est à l'étude pour les mélanomes cutanés métastatiques de stade très avancé (Simon & Uslu, 2018 ; Wiesinger et al., 2019). Cependant, ces travaux concernent, pour le moment, uniquement le mélanome cutané. Toutefois, une récente étude a montré que ces cellules modifiées pouvaient tuer les cellules de mélanome cutané et uvéal *in vitro*, comme *in vivo* (Forsberg et al., 2019).

2.4.2.5 Perspectives

Malgré les avancées qui ont été faites ces dernières années dans la compréhension des mécanismes oncogéniques impliqués dans le mélanome uvéal, la survie des patients ne s'est hélas, pas améliorée. Il est donc urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques. La prise en charge des mélanomes uvéaux est complexe. Les patients ont montré de nombreuses résistances aux traitements. Malgré l'hétérogénéité tumorale, l'idéal serait de concevoir une thérapie ciblée qui pourrait être injectée directement dans la tumeur et qui ciblerait également les métastases hépatiques.

Partie 3 : miARN & cancer

1 Rôle des miARN dans le cancer

En régulant l'expression de très nombreux transcrits, les miARN sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. La dérégulation de leur expression et/ou activité les implique dans de multiples maladies dont le cancer (Peng & Croce, 2016). Les cellules cancéreuses sont caractérisées par différentes altérations spécifiques (*Hallmarks of cancer* en anglais) qui ont été initialement définies par Hanahan et Weinberg en 2000, et sont au nombre de six. Ces altérations aboutissent à la prolifération cellulaire accrue, une « autosuffisance en signaux de croissance », une insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, une résistance à la mort cellulaire, une capacité à répliquer le matériel génétique indéfiniment, une induction de l'angiogenèse et une capacité à former des métastases (Hanahan & Weinberg, 2000). Cette liste a par la suite, été complétée par l'ajout de quatre autres caractéristiques : la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, ainsi que l'implication du système immunitaire, l'inflammation et l'instabilité du génome (Hanahan & Weinberg, 2011). En ciblant des transcrits impliqués dans l'un ou plusieurs de ces processus clés du cancer, les miARN ont un rôle majeur en cancérologie.

De nombreux mécanismes peuvent être à l'origine de la dérégulation de l'expression des miARN. Les gènes des miARN peuvent être amplifiés ou au contraire « perdus », la biogénèse ou la transcription des miARN peut aussi être perturbée ou encore des modifications épigénétiques peuvent affecter leur expression (Peng & Croce, 2016). Selon les gènes ciblés par les miARN, ceux-ci possèdent un rôle suppresseur de tumeur ou un rôle pro-oncogénique. Les paragraphes suivants viennent illustrer ces deux catégories de miARN à partir d'exemples.

Il est important de noter que le caractère suppresseur de tumeur ou oncogène est dépendant du contexte tissulaire/cellulaire (M. Cui et al., 2019).

1.1 miARN avec une activité oncogénique

Lorsque certains miARN sont sous-exprimés, la prolifération ou la survie cellulaire peut être réduite. Au contraire, on peut observer le phénotype inverse en cas de surexpression du miARN. Ces miARN présentent donc une activité oncogénique. Ils sont souvent sur-exprimés ou possèdent une activité augmentée au cours du processus tumoral. Ces miARN considérés comme oncogènes sont aussi appelés des oncomiR (Finoux & Chartrand, 2008).

Parmi les miARN oncogéniques, un des plus étudiés est le cluster miR-17-92. La région 13q31-32 est fréquemment amplifiée dans les lymphomes à cellules B. Ce locus contient un cluster de gènes qui codent pour les miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 et miR-92 (Tagawa & Seto, 2005). Ce cluster est retrouvé sur-exprimé aussi dans d'autres types de cancers, comme le cancer du poumon ; son rôle y serait de favoriser la prolifération cellulaire (Hayashita et al., 2005). Cette région n'est pas systématiquement amplifiée. En effet, des études à l'échelle du génome ont montré que cette région peut aussi être perdue dans environ 16,5 % des cancers ovariens, 22 % des cancers du sein et 20 % des mélanomes ; ce qui montre que les altérations cytogénétiques influençant l'expression des miARN sont associées à des types de cancer précis (L. Zhang et al., 2006).

Le cluster miR-17-92 peut présenter un niveau d'expression augmenté, indépendamment d'une altération cytogénétique. La surexpression du facteur de transcription c-Myc est responsable de la surexpression de ces miARN en transactivant le promoteur de ce cluster (O'Donnell et al., 2005). Différents mécanismes peuvent aboutir à la surexpression d'oncomirs.

1.2 miARN avec une activité suppresseur de tumeur

Contrairement aux oncomirs, les miARN suppresseurs de tumeur sont souvent sous-exprimés. Les membres d'une même famille ont fréquemment des fonctions redondantes ou partiellement redondantes. En effet, leur région *seed* identique leur confère des cibles communes. De ce fait, généralement seule la perte de fonction de plusieurs miARN d'une même famille peut entraîner un phénotype perte de fonction

grave. Cependant, des phénotypes peuvent être observés après la perte de fonction d'un seul miARN, d'autant plus lorsqu'il s'agit d'un miARN majoritairement exprimé par rapport aux autres membres de la famille (Bartel, 2018). Pour caractériser de tels phénotypes, différentes études ont utilisé des souris « déplétées » pour un seul miARN. Par exemple, la déplétion du miR-15a et miR-16-1 augmente la prolifération cellulaire des cellules B et un phénotype de leucémie lymphoïde chronique (Klein et al., 2010). Dans un contexte tumoral, les miARN suppresseurs de tumeurs sont souvent sous-exprimés. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à la perte d'activité de miARN suppresseurs de tumeur.

Le paragraphe précédent décrit la régulation positive de l'expression de certains miARN par c-Myc. Ce facteur de transcription peut aussi exercer son activité oncogénique en réprimant les miR-15a, miR-26, miR-29, miR-30 et aussi la famille de let-7 (Chang et al., 2008). De même, la protéine p53 peut induire l'expression de miARN comme le miR-34a. Ce miARN favorise l'arrêt de la prolifération cellulaire, la sénescence et l'apoptose. En retour, le miR-34a favorise l'expression de p53 en dégradant un de ses régulateurs négatifs. La fonction suppresseur de tumeur de l'axe miR-34a et p53 est très étudiée (Yamakuchi & Lowenstein, 2009). Des régulations épigénétiques peuvent également influencer l'expression de miARN. Les métastases cérébrales sont une cause importante de mortalité chez les patients atteints de cancer, et notamment de cancer du poumon non à petites cellules. Dans les métastases issues de ce cancer, le miR-145 a pour cibles les ARNm qui codent des protéines oncogéniques comme OCT-4, EGFR, c-MYC ou MUC-1. Cependant, son niveau d'expression est restreint par des modifications épigénétiques sur le promoteur du gène, telles que des méthylation sur le promoteur du gène du miARN. Ces modifications épigénétiques sont directement impliquées dans le processus tumoral et métastatique par modification de l'expression d'un miARN (Donzelli et al., 2015).

2 Les miARN comme biomarqueurs

2.1 L'expression des miARN

Les miARN peuvent avoir un rôle important dans la survenue et la progression du cancer. De ce fait, ils peuvent être utilisés comme outils de diagnostic, utiles au pronostic. Ils présentent l'avantage d'être faciles à doser et relativement stables.

Plusieurs études ont établi des signatures de miARN qui peuvent différencier les patients atteints d'une tumeur maligne des patients atteints d'une tumeur bénigne, dans certaines conditions (Stahlhut & Slack, 2013).

L'équipe d'Éva Hernando a établi une signature de miARN permettant de prédire le risque de développement de métastases cérébrales pour les patients atteints de mélanome primaire. Ces chercheurs ont identifié une signature composée de quatre miARNs : miR-150-5p, miR-15b-5p, miR-16-5p, ainsi que miR-374-3p, qui permettent d'affiner la prédiction du risque métastatique (Hanniford et al., 2015). Une autre étude parue plus récemment a identifié une signature de cinq miARN (miR-25, miR-204, miR-211, miR-510, miR-513c) ayant une valeur pronostique importante. Alors que le miR-204 corrèle positivement avec le pronostic, les miR-25, miR-211, miR-510 et miR-513c sont corrélés négativement avec le pronostic (Lu et al., 2019). Les multiples signatures identifiées présentent parfois un très faible nombre de miARN en commun. Cela peut venir des différentes cohortes utilisées et de leur taille, mais également des méthodes d'analyse, ainsi que des critères d'inclusion des patients (Jayawardana et al., 2016).

Les miARN peuvent aussi aider à affiner le diagnostic, notamment pour ce qui concerne le stade du cancer. Par exemple, dans les adénocarcinomes du canal pancréatique une signature de sept miARN permet d'établir un meilleur diagnostic que les marqueurs cytogénétiques classiques (Tan et al., 2018). Dans un contexte de cancer du sein positif aux récepteurs aux oestrogènes qui ont été traités au tamoxifen, une surexpression du miR-210 est associée à un fort risque de rechute et une réduction de la survie sans rechute (Rothé et al., 2011).

2.2 Les miARN circulants

Les miARN extracellulaires peuvent aussi être retrouvés dans les fluides comme le plasma, le sérum, la salive, etc. Ces miARN circulants ont été parfois corrélés à la progression et au stade du cancer. Ces miARN sont donc de bons candidats non invasifs, pour la prédiction et le diagnostic précoce de cancers.

Il existe des miARN tissus-spécifiques, et leur expression peut différencier entre les patients atteints de cancer du sein, colorectal, gastrique, pulmonaire ou encore du pancréas, et les personnes saines. Ils peuvent être utilisés pour le diagnostic précoce (Cui et al., 2019). Par exemple, l'expression du miR-21 peut être associée au stade du lymphome diffus à grandes cellules B. Les patients au stade précoce expriment une concentration supérieure de miR-21 dans le sérum comparativement aux patients atteints de stade III ou IV (Chen et al., 2014).

Les miARN circulants peuvent aussi être des outils pronostics. À titre d'exemple, le miR-122 circulant est corrélé au risque métastatique chez les patients atteints de cancer du sein aux stades II et III, sans être associé au statut hormonal. Cependant, les protocoles permettant de les isoler et de maintenir leur intégrité nécessitent parfois d'être optimisés pour avoir une procédure fiable et standardisée. De plus, les concentrations de miARN circulants sont relativement faibles ; ce qui les rend parfois difficile à doser (Cui et al., 2019).

3 Les miARN comme outil thérapeutique

Les miARNs étant dérégulés dans de nombreux cancers (et autres pathologies), des approches thérapeutiques les ciblant spécifiquement ont été conçues. Concernant le cancer, les thérapies anti-cancéreuses visent à restaurer l'activité des miARN avec une activité suppresseurs de tumeur et, au contraire, à inhiber l'activité des miARN oncogéniques. Une des limitations à l'utilisation de telles stratégies est la toxicité et les effets hors cibles dus au grand nombre de cibles des miARN.

3.1 Les inhibiteurs de miARN

Des anti-miR, appelés parfois AntagomiR, ont été développés. Il s'agit d'oligonucléotides antisens ; des molécules d'acide nucléique simple brin qui, par complémentarité de séquences, ciblent spécifiquement un miARN pour en inhiber la fonction. Différentes modifications chimiques sont utilisées pour accroître leur stabilité en empêchant leur dégradation par les nucléases plasmatiques et tissulaires. Ces différentes chimies sont décrites dans la revue présentée en résultat 2. Le Miravirsen (Roche/Santaris) est un anti-miR qui cible spécifiquement le miR-122 pour le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C. miR-122 est spécifique du foie et participe à la réplication du virus en stabilisant le génome viral (Gebert et al., 2014). Les patients atteints de cette pathologie ont plus de risques de développer un cancer du foie. Ce traitement a montré une bonne efficacité en essai de phase II. Plusieurs autres molécules ciblant ce miARN sont en cours d'étude (Quemener et al., 2020 ; Van Der Ree et al., 2016).

3.2 Les miRNA synthétiques thérapeutiques

Des miARN synthétiques peuvent être utilisés comme stratégie thérapeutique. En effet, les TargomiRs sont en essai de phase I et ont montré des résultats encourageants. Il s'agit de vecteurs qui contiennent des miRNA synthétiques et un système d'anticorps pour reconnaître spécifiquement les cellules cibles, encapsulées dans des capsules bactériennes. Dans un premier essai humain, ces TargomiR sont utilisés pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules, ainsi que du cancer pleural. Ce TargomiR s'appelle le MesomiR-1. Il mime le miR-16 et est encapsulé avec l'anticorps anti-EGFR pour spécifiquement cibler les cellules pulmonaires. Face aux résultats prometteurs de l'essai de phase I, un essai de phase 2 est prévu prochainement (Hanna et al., 2019 ; Reid et al., 2013 ; van Zandwijk et al., 2017).

Malheureusement, certains traitements à base de miARN synthétiques ont montré une forte toxicité. C'est pourquoi l'essai clinique visant à traiter l'hépatocarcinome et le carcinome rénal a été arrêté (miR-34 synthétique). Il est nécessaire d'optimiser la spécificité de ces molécules (Bajan & Hutvagner, 2020). Afin

de les rendre spécifiques de leur cible. Il est possible pour cela, de modifier leur chimie ou de les coupler à des molécules qui reconnaîtront spécifiquement un type cellulaire. Le couplage à des molécules afin d'augmenter la spécificité est utilisé pour certains oligonucléotides antisens comme les anti-miR, et plus particulièrement l'inhibiteur du miR-122 décrit dans le paragraphe précédent. L'anti-miR-122 (RG-101, *Regulus Therapeutics*) a été couplé à des N-acetylgalactosamine. Cette molécule se lie à des récepteurs spécifiquement exprimés à la surface des hépatocytes (le récepteur de l'asialoglycoprotéine) (Quémener et al., 2020 ; Van der Ree et al., 2017).

3.3 Autres stratégies thérapeutiques qui ciblent les miARN

Les miARN étant au centre de nombreux processus biologiques, des stratégies thérapeutiques se multiplient pour les remettre en activité ou alors pour en inhiber la fonction. Les éponges à miARN visent à limiter l'activité d'un miARN. Il est également possible d'utiliser des oligonucléotides antisens pour masquer un site de liaison d'un miARN : soit pour limiter la dégradation d'un ARNm, soit pour libérer un miARN qui est séquestré (Gilot et al., 2017). Ces stratégies font notamment l'objet de la revue présentée en résultat 2 (Quémener et al., 2020).

4 L'implication du miR-16 dans le processus tumoral

Deux loci codent pour le hsa-miR-16-5p (miR-16) : l'un est situé dans l'intron du non codant *DLEU2* sur le chromosome 13 codant pour miR-16-1 et le second dans l'intron du gène *SMC4* sur le chromosome 3. Le miR-16 mature issu de ces deux loci est identique en séquence.

Le miR-16 est l'un des premiers miARN à avoir été décrit comme ayant un puissant rôle suppresseur de tumeur. L'équipe du Dr Croce a identifié une délétion fréquente de la région 13q14 dans les leucémies lymphoïdes chroniques. Cette région contient les gènes qui codent le miR-16-1 et le miR-15a. Cette délétion entraîne la diminution d'expression de ces deux miARN (Calin et al., 2002).

Plus tard, des études ont montré que miR-16 avait un rôle suppresseur de tumeur en induisant l'apoptose ayant pour cible des facteurs anti-apoptotiques comme *B-cell lymphoma 2 (BCL2)*, protéine sur-exprimée dans plusieurs types de cancers (Cimmino et al., 2005). Ces observations ont été confirmées avec le modèle murin. La délétion de ce locus chez des souris entraîne l'apparition du phénotype associé à la leucémie lymphoïde chronique de l'humain. Cette étude démontre bien le rôle de ces miARN dans la survenue de ce type de leucémie (Calin et al., 2008 ; Klein et al., 2010). Un autre mécanisme peut également conduire à la perte d'expression de miR-16 dans les leucémies lymphoïdes chroniques. En effet, les histones déacétylases sont sur-exprimées, ce qui entraîne une répression épigénétique de miR-16 (Sampath et al., 2012).

De nombreuses études ont examiné l'implication de miR-16 dans le processus tumoral. Les membres de la famille de miR-16 ont été décrits comme ayant un rôle de suppresseurs de tumeur et étant sous-exprimés dans différents cancers comme : le gliome, le cancer colorectal, le cancer de la vessie, le cancer de la prostate, ainsi que différents types de lymphomes et leucémies. Bien que le miR-16 ait été décrit comme étant sous-exprimé dans certains types de cancers et ayant une fonction suppresseur de tumeurs, il peut être retrouvé sur-exprimé dans certains cas. Par exemple, le miR-16 circulant est retrouvé enrichi dans le sérum des patients atteints d'adénocarcinome gastrique. Il peut servir de marqueur pronostic (Zhu et al., 2014). Une méta-analyse a mis en évidence le potentiel de la famille de miR-16 dans la prédiction du pronostic dans plusieurs cancers (J. Cui, 2015).

En condition physiologique, le miR-16 joue un rôle important dans plusieurs processus biologiques comme la régulation de la fonction immunitaire ou la régulation négative de l'angiogénèse et le cycle cellulaire (Huang, Liu & Chu, 2015).

Le miR-16 fait partie d'une famille qui comprend : miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-103a-3p, miR-107, miR-195-5p, miR-424-5p, miR-497-5p, miR-503-5p et miR-646. Ils sont caractérisés par la même région *seed* : « AGCAGC ». Ces miARN partagent un grand nombre de gènes cibles, mais pas la totalité. Ces variations peuvent expliquer les différentes signatures observées pour chacun des miARN et aussi le fait que la perte de fonction de l'un d'entre eux ne peut être compensée par l'expression des autres membres de la famille. De plus, les gènes faisant partie du même cluster

partagent plus de cibles en commun qu'avec les autres membres de la famille. Ceci explique également que la perte du locus contenant à la fois le miR-15a et le miR-16-1 ne puisse être compensée par les autres membres de la famille (S. Wang et al., 2019). Le miR-16 et le miR-15 sont très fortement exprimés comparativement aux autres membres de la famille, ce qui rend plus difficile une compensation par d'autres miARN moins exprimés de la famille (W. X. Wang et al., 2014). Pour finir les miARN de la famille de miR-16 possèdent, par définition, la même séquence que leur région *seed*. Les interactions pouvant se faire avec des sites compensatoires ou par des appariements non canoniques, leurs rôles ne sont donc pas nécessairement parfaitement identiques.

5 miARN et mélanome uvéal

Des miARN ont également été décrits comme étant différentiellement exprimés chez les patients atteints de mélanomes uvéaux en fonction du risque métastatique (faible *vs* élevé). Différentes études ont été menées pour identifier des miARN capables de prédire le pronostic. La première a été réalisée par Worley et ses collaborateurs (Worley et al., 2008). Ils ont établi une liste de six miARN distinguant les patients atteints d'un mélanome uvéal de faible risque métastatique *vs* risque métastatique élevé. Parmi cette liste, le miR-199a et let-7b ont particulièrement été mis en avant comme ayant un différentiel d'expression important pour discriminer ces deux groupes de patients. D'autres études se sont succédées, comme celle de Radhakrishnan et ses collaborateurs (Radhakrishnan et al., 2009), celle de Smit et son équipe (Smit et al., 2019) ou encore celle du TCGA (Robertson et al., 2018). Une récente publication a analysé les différences et similitudes entre trois études sélectionnées pour analyser l'expression des miARN sur des cohortes bien définies de patients. Il s'agit de la cohorte de Worley et ses collaborateurs, de Robertson et ses collaborateurs (TCGA), ainsi que Smit et ses collaborateurs (Robertson et al., 2018 ; Smit et al., 2019 ; Worley et al., 2008). De façon surprenante, un faible recouvrement est observé. Seuls les miARN let-7b, miR-199a, miR-143, miR-155 et miR-21 pour les miARN sur-exprimés, et seul le miR-181a, pour les miARN sous-exprimés, ont été retrouvés, dans au moins deux études, associés à un risque métastatique plus élevé. Le miR-16 a été décrit comme

pouvant être associé au pronostic dans seulement une de ces études (Smith et ses collaborateurs). Ce faible taux de recouvrement peut s'expliquer par les différentes technologies utilisées (puces ou séquençage), et la taille des effectifs de certaines études (Aughton et al, 2020).

Une étude très récente de Stark et ses collaborateurs a mis en évidence un panel de six miARN circulants dont le miR-16 et ils montrent une différence significative entre les patients atteints de tumeurs bénignes (expression du miR-16 plus faible) ou métastatiques (expression du miR-16 plus élevée). Toutefois, aucune différence significative n'a été repérée entre les patients atteints de tumeurs primaires *vs* métastatiques. Cette étude concerne les miARN circulants et non l'expression des miARN dans la tumeur, et elle présente des résultats similaires à ceux qui ont pu être observés pour l'adénocarcinome gastrique (Zhu et al., 2014). Il faut aussi noter que, dans cette étude, les effectifs respectifs de chaque groupe sont très différents. En effet, le nombre de patients atteints de mélanome uvéal métastatique est très faible en comparaison du nombre de patients atteints de tumeurs localisées ou de naevus (Stark et al., 2019).

Objectifs

Mise en contexte et objectifs de thèse

Selon une étude menée dans le cadre du plan Cancer 2014-2019 en France, visant à analyser l'incidence et la mortalité des cancers, le mélanome cutané est l'un des cancers dont l'incidence a le plus augmenté parmi les tumeurs solides entre 2010 et 2018 (+ 3,4 % chez l'homme et + 2 % chez la femme). Cet accroissement d'incidence est majoritairement attribué aux nouveaux comportements vis-à-vis de l'exposition solaire avec une augmentation de l'exposition aux rayonnements UV. À contrario, l'incidence du mélanome uvéal reste relativement stable. Aucune évolution significative de l'incidence n'a été observée entre 1980 et 2018.

Alors que le traitement du mélanome cutané métastatique a connu une véritable révolution grâce à l'immunothérapie, d'une part, et au développement des thérapies ciblées, d'autre part, le mélanome uvéal ne dispose pas de thérapie efficace dès lors qu'il atteint le stade métastatique. En effet, le mélanome uvéal est résistant aux immunothérapies et l'utilisation des thérapies ciblées de référence dans le mélanome cutané (inhibiteurs de BRAF ou MEK) n'est pas possible, car la génétique du mélanome uvéal est différente. De ce fait, il est urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'équipe Expression des Gènes et Oncogenèse a mis en évidence dans le mélanome cutané un phénomène de séquestration du miR-16, puissant suppresseur de tumeurs, sur l'ARNm de *TYRP1*. Le miR-16 est connu pour être sous-exprimé dans différents types de cancer. Ayant pour cibles des facteurs anti-apoptotiques comme *B-cell lymphoma 2 (BCL2)* ou *myeloid cell leukemia 1 (MCL1)*, ou d'autres pro-oncogènes comme *cycline D1 (CCND1)*, le miR-16 a un rôle suppresseur de tumeurs puissant (Cimmino et al., 2005). L'équipe GEO a montré, avant notre arrivée au laboratoire, que la séquestration de ce miARN supprime, sinon réduit, son activité suppresseur de tumeurs. Ce phénomène participe à la progression tumorale. Cette découverte a permis le développement d'oligonucléotides anti-sens, les *Target Site Blockers* (TSB), efficaces *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* sur le modèle murin (xénogreffe dérivée de

la tumeur du patient ou *Patient-derived xenograft* : PDX). Ces oligonucléotides sont des *mixmers* d'ADN et de LNA (*locked nucleic acid*). Cette chimie les rend insensibles à la dégradation par la RNase H. Les TSB ont été conçus afin de s'hybrider à la place du miR-16 sur *TYRPI* pour empêcher sa séquestration et ainsi restaurer son activité suppresseur, sans pour autant dégrader l'ARNm de *TYRPI* (Gilot et al., 2017). Cette stratégie thérapeutique innovante est indépendante du fond génétique du cancer. Seule la séquestration du miR-16 est à prendre en considération.

Plusieurs éléments doivent être réunis pour que les TSB puissent être considérés comme étant de bons candidats. Premièrement, le miR-16 doit être séquestré. Ensuite, l'éponge qui en est responsable doit être fortement exprimée. En effet, pour qu'un ARN puisse « éponger » un miARN, il faut que son expression soit suffisante pour permettre la liaison d'un grand nombre de miARN. En d'autres termes, il faut que le ratio quantité de miARN sur quantité de sites de liaison disponibles soit le plus petit possible.

Les cellules de mélanome uvéal, comme les cellules de mélanome cutané, sont caractérisées par une expression très importante de *TYRPI* et de miR-16. Bien qu'elles soient très différentes des cellules de mélanome cutané, notamment par leur fond génétique, les cellules de mélanome uvéal possèdent les caractéristiques nécessaires pour que les TSB puissent être de bons candidats thérapeutiques. Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur l'utilisation des TSB comme traitement potentiel du mélanome uvéal métastatique. Le tropisme hépatique particulier des métastases de mélanome uvéal les rend d'autant plus pertinents au regard de leur biodisponibilité élevée au niveau du foie.

Mes premiers résultats ont permis de mettre en évidence que malgré une forte expression de miR-16 dans les cellules, il ne semble pas être pleinement actif. Ces résultats suggèrent que le miR-16 est séquestré, comme dans les cellules de mélanome cutanées. Pour autant, malgré une très forte expression de *TYRPI*, nos études préliminaires ont montré que miR-16 ne semblait pas être séquestré sur *TYRPI*. De ce fait, les TSB utilisés avec un *design* spécifique de *TYRPI* ne sont pas efficaces pour le mélanome uvéal. Cependant, étant spécifiques du ou des ARN sur le/lesquels miR-16 est séquestré dans le mélanome uvéal, la stratégie à base de TSB demeure prometteuse. Plusieurs oligonucléotides antisens sont maintenant utilisés en clinique après avoir

obtenu une autorisation par les agences compétentes (*European medicines agency* en Europe ou *U.S. Food and Drug Administration* aux USA), ce qui atteste de leur efficacité et de leur innocuité (Quémener et al., 2020).

Mes travaux de thèse ont donc pour objectif d'identifier le mécanisme moléculaire responsable de l'inactivité du miR-16 dans le mélanome uvéal.

Pour cela, j'ai déterminé l'ensemble des ARN qui interagissent avec miR-16, ce qui définit un vaste réseau (interactome du miR-16). Cet interactome comprend à la fois les potentielles éponges de miR-16, mais aussi ses cibles. Nous avons donc : 1) confirmé certaines cibles déjà connues dans d'autres modèles cellulaires, 2) identifié de nouvelles cibles de miR-16 dans le mélanome uvéal et 3) établi la liste d'ARN dont l'expression est augmentée en réponse au miR-16. Ces derniers ARN constituent les potentielles éponges à miR-16, c'est-à-dire des ARN responsables de sa séquestration. Ces résultats font l'objet d'un article scientifique intitulé « Nouveau rôle fonctionnel des miARN, déterminé par un appariement non canonique », présenté dans la première partie des résultats (Résultats 1), et qui va prochainement être soumis.

Ce travail de thèse a également donné lieu à un travail bibliographique portant sur l'utilisation des oligonucléotides antisens comme stratégie thérapeutique. La découverte de l'ARN interférence, ainsi que des miARN décrits en introduction, a ouvert de nouvelles perspectives en termes de prise en charge thérapeutique. Ces petites séquences nucléiques synthétiques offrent une grande diversité de modes d'actions et une adaptabilité telles qu'il est possible de concevoir une molécule spécifique à une anomalie génétique pour chaque patient. Du fait de leurs nombreuses modalités d'action et de l'absence de toxicité, ces ASO sont testés dans diverses maladies. Cette revue a la particularité de décrire de nombreux modes d'actions différents en s'appuyant sur des exemples de molécules thérapeutiques, qu'elles soient déjà commercialisées ou encore à l'étape des tests *in vitro*. Cette revue est publiée dans le journal *WIREs RNA* et fait l'objet de la seconde partie des résultats (Résultats 2). Une illustration de vulgarisation de l'article a été retenue pour être publiée en couverture de l'édition dans laquelle il a est paru (Résultat 2). Une présentation de

cette revue a également été publiée sous la forme d'un court résumé sur le site internet *Advanced Science News*¹ présenté en annexe 1.

¹ <https://www.advancedsciencenews.com/targeting-the-untargetable-and-treating-the-untreatable/>

Résultats

Résultats 1 : Article scientifique

Nouveau role fonctionnel des miARN déterminé par un appariement non canonique, impliqué dans l'agressivité du mélanome uvéal

Article en cours de finalisation

L'implication des miARN dans la survenue et le développement de nombreuses pathologies est de plus en plus étudiée, notamment dans le contexte tumoral. La perte ou la réduction de l'activité suppresseur de tumeurs d'un miARN est observée dans de nombreux cancers.

Le miR-16 est un puissant suppresseur de tumeurs, dont l'expression altérée est impliquée dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Ce miARN est codé par deux loci, l'un présent sur le chromosome 3 et l'autre sur le chromosome 13. La diminution de son expression dans la LLC est due à une délétion du locus présent sur le chromosome 13.

Le mélanome uvéal est un cancer rare pour lequel il n'existe actuellement pas de thérapie efficace dès lors qu'il atteint le stade métastatique. Il est donc essentiel de mieux comprendre cette pathologie afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'une des caractéristiques majeures de ce cancer est la présence de monosomie du chromosome 3 dans environ 50 % des cas de mélanome uvéal.

Notre étude vise à caractériser l'activité du miR-16 dans le mélanome uvéal. Nous nous attendions à observer une diminution de l'expression du miR-16 et ainsi une réduction de son activité suppresseur de tumeur chez les patients porteurs d'une monosomie 3, et donc présentant le plus mauvais pronostic.

Pour commencer, nous avons montré que, bien que possédant des altérations chromosomiques susceptibles d'affecter le niveau d'expression du miR-16, les patients ou les lignées cellulaires de mélanomes uvéaux possèdent une forte expression du miR-16 sans que l'altération chromosomique n'ait de conséquence sur l'expression du miARN.

En combinant deux approches complémentaires, une analyse transcriptomique en cinétique suite à la transfection de miR-16 synthétique et une précipitation des ARN liés au miR-16 synthétique, nous avons établi une liste des partenaires directs du miR-16 ayant une influence sur son activité. Cette liste peut se diviser en deux groupes. En effet, la transfection du miR-16 synthétique entraîne la répression de certains gènes (targetomes), correspondant à l'activité canonique des miARN, mais elle provoque aussi, de façon inattendue, la surexpression d'autres gènes. Nous avons donc établi la liste des potentielles cibles de miR-16 ainsi que de ces partenaires surexprimés (interactomes miR-16). Le but étant de définir l'activité de miR-16, c'est-à-dire la dégradation de ces ARN cibles, et d'identifier les ARN sur lesquels miR-16 se fixe provoquant la réduction de son activité.

Grâce à ces listes de gènes, nous avons identifié de nouvelles cibles du miR-16 dans le mélanome uvéal et aussi des partenaires surexprimés qui détournent le miR-16 de ces cibles dites classiques. Afin de restaurer une activité suppresseur de tumeurs efficace, nous proposons de nouveaux gènes candidats pour lesquels nous pourrions bloquer les sites de fixation du miR-16 afin de le rediriger vers ses cibles. Ainsi, nous avons identifié *PYGB* comme participant à la séquestration de miR-16.

Pour finir, nous avons démontré que les listes obtenues sont directement corrélées avec la survie des patients. Elles ont donc une valeur pronostique, confirmant l'importance de l'activité du miR-16 dans les cellules de mélanome uvéal.

1
2 **New functional role of miRNAs determined by a noncanonical**
3 **pairing involved in the aggressiveness of uveal melanoma**

4 Anaïs M. Quéméner¹, Laura Bachelot¹.....and David Gilot^{1,2,*}.

5
6 ¹ Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de génétique et développement de Rennes)-UMR 6290,
7 F-35000, Rennes, France.

8 ² Univ Rennes, INSERM, U1241, F-35000, Rennes, France.

9 ³ CNRS UMR 7275, 06560 Sophia Antipolis, France.

10 ⁴ CHU Rennes, Service de Génétique Moléculaire et Génomique Médicale, Rennes, France.

11 ⁵ Univ Rennes, Plateforme GEH, CNRS, Inserm, BIOSIT - UMS 3480, US_S 018, F-35000,
12 Rennes, France.

13 * Corresponding author: David Gilot, +33(0)223234441, david.gilot@univ-rennes1.fr

14
15 **Keywords**

16
17 Tumor suppressor, miRNA interactome, miR-16, Uveal Melanoma, non canonical base pairing,
18 miRNA targetome

19
20 **Additional information**

- 21
22
- The authors declare no potential conflicts of interest.
 - Financial support : Fondation ARC pour la Recherche ; Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) ; Départements du Grand-Ouest ; Région Bretagne ; University of Rennes 1 ; CNRS ; SFR Biosit ; Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur and Rennes Métropole.
- 23
24
25
26
27

28

29 **ABSTRACT**

30 Alteration of tumor suppressor activity of miRNA explains inception of cancers as described
31 for MIR16-1 deletion in chronic lymphocytic leukemia. Loss of miRNA activity can likewise
32 be observed when miRNA expression level is normal. Thus, miRNAs activity can be impaired
33 for instance by miRNA sequestration on RNAs. Here, we investigated the molecular
34 mechanism involved in the impairment of miR-16 tumor suppressor activity. By combining
35 functional experiments (miR-16 pull-down assay followed by RNA-sequencing and
36 transcriptome profiling), we defined the miR-16 interactome. In addition to the canonical
37 miRNA targets, we identified a set of miR-16-interacting RNAs called thereafter miR-16
38 sponges since miR-16 binds to these RNAs without provoking their decay. Mechanistically, the
39 miR-16/RNA non-canonical base-pairing promoted stability and translation of mRNAs
40 involved in cancer cell proliferation such as *PTP4A3* and *NDRG1*. Since non-canonical miR-
41 16 activity led to gain-of-function of these pro-tumoral genes, we propose that miR-16 can exert
42 pro- or anti-tumoral activity in function of its base-pairing to RNAs. The biological relevance
43 has been challenged in uveal melanoma. We demonstrated that miR-16 activity assessment
44 using our RNA-signature is useful to identify the patients developing metastasis and
45 discriminate the patient's overall survival as efficiently than the current method based on copy
46 number variations and driver mutations detection. Our results expand our current knowledges
47 on gene expression regulation driven by miRNA and highlight the pro-tumoral role of the non-
48 canonical base-pairing.

49

50

51

52

53

54 **INTRODUCTION**

55 Gene expression pattern determines cell fate such as cell proliferation or quiescence.
56 miRNAs, by inducing RNA decay, shape gene expression. The regulation of miRNA activity
57 is complex and not so far elucidated. To date, miRNA expression levels are commonly used to
58 estimate the miRNA activity in literature. However, miRNA expression is not always correlated
59 to miRNA activity (Bartel, 2009). For instance, miRNA activity can be regulated by direct
60 miRNA modifications such as m6A, usually not assessed in RNA-sequencing experiments
61 (Bartel, 2018; Konno et al., 2019). Indirect regulations can also modulate miRNA activity.
62 Among these mechanisms, miRNAs have been shown to interact with different classes of RNAs
63 including mRNAs, lncRNAs and circRNA (defined as the miRNA interactome). In function of
64 the miRNA and the miRNA/RNA base-pairing, miRNAs can promote the RNA decay via the
65 seed region (defined as miRNA targetome). However, increasing evidences indicate that
66 miRNAs bind to a subset of RNAs without inducing their decay. In this latter case, the base
67 pairing between seed region of miRNA and the RNA is imperfect. The biological role of these
68 imperfect interactions is still matter of debate. It has been proposed that these interactions are
69 artefactual, rare and not relevant since the miRNAs do not exert decay activity (Agarwal et al.,
70 2015; Bartel, 2018). Nevertheless, experiments based on Cross Linked Immunoprecipitation
71 (CLIP) and alternative methods, performed by different teams, identified such interactions
72 (Grosswendt et al., 2014; Helwak et al., 2013; Loeb et al., 2012; Luna et al., 2015).

73 It has been hypothesized that the imperfect miRNA binding to RNAs restricts the RNA
74 decay of other RNAs expressing a complementary sequence to the miRNA seed region (Bartel,
75 2009). In other words, miRNA can be inactivated when they are “sponged” or “sequestered” in
76 RNAs via imperfect binding (also known as non-canonical binding). This concept, initially
77 described in *Arabidopsis thaliana*, relies on a competition between RNAs to bind to a limited

78 amount of miRNAs. This model has been extended to eukaryotes as the competing endogenous
79 RNAs model (Salmena et al., 2011) but this concept is based on miRNA/RNAs canonical base
80 pairing. However, these demonstrations are still matter of debates since the stoichiometry
81 between miRNA and RNAs (sponges) is not (or rarely) investigated. We recently summed up
82 the criteria for a miRNA sponge (Migault et al., 2017). Briefly, a sponge should be highly
83 expressed to sequester all the targeted-miRNA and ideally should contain several imperfect
84 miRNA binding sites per linear RNA molecule such as *TYRPI* mRNA (Gilot et al., n.d.). The
85 sequestration of miRNAs has also been illustrated *in vivo* on circular RNAs (Hanniford et al.,
86 2020; Kleaveland et al., 2018), confirming the physiological relevance of this type of miRNA
87 regulation. Due to the circular shape, canonical miRNA binding sites are compatible with
88 miRNA sponging activity of circRNAs. To date, well-characterized miRNA sponges are rare
89 in the literature due to the specific expression pattern of circRNAs and the difficulties to predict
90 imperfect base-pairing between miRNA- and sponges using current algorithms for linear
91 RNAs.

92 Here we investigated how miRNA activity is regulated by determining the miRNA
93 interactome and its functional consequences. As model, we focused on the well-described
94 tumor suppressor miR-16. An abnormal expression level of miR-16 due to the deletion of
95 *DLEU2* locus is associated to prostatic cancer, pituitary cancer or chronic lymphocytic
96 leukemia (CLL) (Aqeilan, et al.,2010; Bottoni et al., 2005; Calin et al., 2008), endorsing the
97 importance of miR-16 expression level and activity in a clinical context. Despite a high
98 expression level, we demonstrated that canonical miR-16 activity is impaired in uveal
99 melanoma by miR-16 sequestration on several mRNAs. Cancer cell hijacks miR-16 activity to
100 promotes mRNA stability and translation via non-canonical base pairing instead of limiting cell
101 cycle progression via its canonical (RNA decay) activity. In conclusion, our results strongly
102 suggest that miR-16 can exert pro- or anti-tumoral activity in function of its base-pairing to

103 RNAs. Our work expands our understanding of the gene expression regulation and highlight
104 the role of RNA/miRNA non-canonical base pairing in cancer.

105

106 **RESULTS**

107

108 **miR-16 is a potent tumor suppressor in uveal melanoma**

109

110 miR-16 is encoded by two intronic loci on the human genome. MIR16-1 is located on the
111 intronic region of *Deleted in Lymphocytic Leukemia 2 (DLEU2)* on the chromosome 13 and
112 MIR16-2 on the introninc region of *Structural Maintenance of Chromosomes 4 (SMC4)* on the
113 chromosome 3. Both are transcribed in pri-miR-16-1 and pri-miR-16-2, then respectively
114 processed in pre-miR-16-1 and pre-miR-16-2 to generate a similar product; miR-16 (Lagos-
115 Quintana et al., 2001; Mourelatos et al., 2002) (Fig. 1A). Since chromosome 3 monosomy is
116 detected in more than 50% of patients with uveal melanoma (Robertson et al., 2018), we
117 postulated that expression level of the tumor suppressor miR-16 might be reduced and
118 consequently impacts the tumor rising as observed for Chronic lymphocytic leukemia (LLC)
119 patients. Complete deletion of *DLEU2* locus containing MIR16-1 is detected in more than 50%
120 of LLC patients and leads to the decrease of miR-16 expression (Calin et al., 2002). We
121 assumed that the loss of the chromosome 3 (monosomy 3) may also lead to a decrease of miR-
122 16 levels (Fig. 1B). As previously shown, we confirmed a 50% decrease of miR-16 expression
123 in leukemia patients' samples mainly due to the absence of pri-miR-16-1 synthesis (Fig. 1C,
124 S1A) (Calin et al., 2002). Next, we examined the expression levels of mature miR-16 in patients
125 with uveal melanoma (TCGA cohort) according to the chromosome 3 copy number.
126 Surprisingly, miR-16 expression is not altered by chromosome 3 monosomy in uveal
127 melanoma, but even in a monosomy context, both locus MIR16-1 and MIR16-2 seems to

128 produce the same amount of miR-16 (Fig 1D, S1B). To reinforce these results, we compared
129 by RT-qPCR the miR-16 expression levels in uveal melanoma cell lines to the miR-16 levels
130 found in 501Mel cell line (cutaneous melanoma), for which we performed for a previous study
131 an absolute quantification of miR-16 by northern-blot experiments (Gilot et al., 2017). miR-16
132 is highly expressed in all 3 uveal melanoma cell lines and seems independent of the
133 chromosome 3 status in these selected cell lines (between 2000 to more than 5000 copies per
134 cell) (Fig. 1E). These cell lines have different chromosome 3 status, determined by
135 Amirouchene-Angelozzi and colleagues and also by Jager and colleagues (Amirouchene-
136 Angelozzi et al., 2014; Jager et al.; 2016) (Fig. 1E).

137 Since we previously demonstrated that miR-16 activity can be impaired by sequestration
138 in cutaneous melanoma despite the high expression level (~4500 copies per cell), we
139 hypothesized that miR-16 might be inactive in uveal melanoma; a rare cancer without effective
140 treatment at metastatic stage. We investigated the biological consequences of miR-16
141 overexpression using a synthetic miR-16 in three uveal melanoma cell lines. Synthetic miR-16
142 significantly decreases cell density after 72h (Fig 1F). Cell density decrease is commonly the
143 consequence of the reduction of proliferation and/or the cell death onset. As attended, we
144 observed an increase in cell death (apoptosis and necrosis) with synthetic miR-16 (Fig 1G,
145 S1C). These results suggested that, miR-16 is a potent tumor suppressor in human uveal
146 melanoma.

147

148 **Definition of miR-16 interactome.**

149 To identify the RNAs modulated by miR-16 interaction, explaining its tumor suppressor
150 activity, we combined results obtained by two complementary methods (Fig. 2). We performed
151 a transcriptomic profiling in kinetic in response to synthetic miR-16 vs a miRNA control in
152 uveal melanoma cells (MP41). We analyzed the transcriptome by RNA-seq at different time

153 points (6h, 12h, 24 and 48h) to observe a progressive decrease (or increase) of mRNA in
154 response to miR-16 or miR-control (miR-CTR) transfection. Timepoints 6h and 12h were
155 grouped as “early timepoint” and timepoints 24h and 48h as “late timepoint”. We analyzed the
156 differentially expressed RNAs between miR-CTR and miR-16 conditions at “early” and “late”
157 timepoints. We selected down regulated genes ($\log \text{Fold Change} \leq -0,5$) in both early and late
158 conditions, which represents $\sim 5\%$ of all transcripts. This seems consistent with the known
159 mRNA decay activity of miRNA (Bartel, 2004). The mRNA decay exerts by miRNAs is usually
160 mediated by a seed base-pairing (miRNA-targeted RNA) (Bartel, 2009). Interestingly, we
161 identified a set of RNAs for which expression levels increased in response to miR-16
162 transfection. We selected increased RNAs using the same threshold ($\log \text{Fold Change} \geq 0,5$),
163 representing $\sim 7\%$ of all transcripts in our model (Fig 2A). This genome-wide analysis identifies
164 modulation of mRNA expression due to direct interaction with miR-16 and indirect effects
165 (secondary targets). To decipher such direct and indirect effects of miR-16, we identified miR-
166 16- interactants using biotinylated-miR-16 (RNA pull-down assay coupled to RNA-seq) (Fig
167 2B). To discard artefactual interactants due to unspecific background inherent to all biotinylated
168 experiments (Dash et al., 2018; Lal et al., 2011; Tan & Lieberman, 2016), we analyzed our data
169 in two steps. Firstly, we plotted the logFC expression in response to miR-16 and the enrichment
170 of these RNAs in pulldown using biotinylated miR-16 (Fig. 2C). miR-16-interactants have been
171 arbitrarily defined ($\text{Log FC} < -0.5$ or > 0.5 and a miR-16 pulldown fold enrichment superior to
172 100). Thus, we defined two windows (b and c) containing respectively 476 and 497 potential
173 miR-16-interactants. Secondly, we removed all RNAs highly detected (> 500 reads) in the
174 biotinylated miR-CTR condition, considering them as false positives candidates. Finally, we
175 obtained 327 miR-16-interactants for which expression levels decreased in response to miR-16
176 transfection, strongly suggesting that these RNAs (b’ window) correspond to miR-16 targets
177 (targetome) in our model. Some of our miR-16 targets have been already identified as miR-16

178 target in the literature such as *CCND1*, *CCND3* and *WEE1*, validating our experimental
179 workflow (Cai et al., 2012; Lezina et al., 2013; Q. Liu et al., 2008). We applied the same filter
180 for the upregulated RNAs and we got an additional cleaned list of 403 miR-16-interactants
181 (window c' on Fig. 2C) (list available on Table.S).

182 The biological function of upregulated miRNA-interactants remains unclear in the literature
183 even if they are already highlighted by different teams (Vasudevan et al., 2007). Here, we
184 postulated that downregulated miR-16 interactants are “real miR-16 targets” and upregulated
185 miR-16 interactants may correspond to “miR-16 sponges”. Since a miRNA-sponge should be
186 highly expressed or/and have a circular shape (circRNAs) (Hansen et al., 2013) and/or contain
187 non-canonical miRNA binding site(s) avoiding its decay (Gilot et al., 2017), we focused on
188 highly upregulated miR-16 interactants (basal normalized expression level > 10) (window c''
189 on Fig. 2C), identifying 57 potential miR-16 sponges in uveal melanoma (list available Table.
190 S).

191 To evaluate this hypothesis (targets and sponges), we looked for canonical miR-16
192 binding sites (or miRNA-recognition element (MRE)) on newly identified miR-16 interactome
193 using the most effective webtool (Targetscan 7.2) (Agarwal et al., 2015), designed to identify
194 seed-dependent miRNA binding on MREs. We found that 30% of miR-16-targets (down-
195 regulated-miR-16-interactants) have a MRE-16 according to Targetscan 7.2 webtool (Fig 2D,
196 2E & S2A). In contrast, only ~8% of all RNAs sequenced in our model have a MRE-16 and
197 only 2% of the upregulated miR-16-interactants (Fig 2G, H, I & S2B). These results are
198 consistent to the hypothesis. To explain why only 30% of miR-16 targets display a MRE-16
199 predicted by Targetscan 7.2, we further examined the miR-16 binding sites on down-regulated
200 RNAs by i) examining the complete sequence of these RNAs and not only their 3'UTR and ii)
201 looking for a partial seed base-pairing using Cistrome SeqPos motif analysis (T. Liu et al.,
202 2011). Interestingly, we found four *de novo* motifs. The most significant motif (#1) looks like

203 to miR-16 binding site (motif #1: GCTGCTG (underlined sequence is complementary to miR:
204 16 sequence: 5' _uAGCAGCac----_3')) and the motif #2 ; CTGCTG are associated to mRNA
205 decay mediated by miRNA. The two other motifs (#3 & #4) contained the GCTG sequence,
206 which is common to these four motifs (Fig. 2F). Interestingly, these motifs are not exactly
207 retrieved in upregulated-miR-16-interactants (sponges) (Fig. S2C). However, motif #1,
208 identified on sponge RNAs ; -GCTG (or T or A) CT-, is quite similar to motif #1 identified on
209 miR-16 targets, except the nucleotide in position 5 (G or T or A). This result suggests that a
210 bulge may be created when the seed sequence of miR-16 binds to the sponge RNAs. This type
211 of bulge is usually described to reduce or abolish the RNA decay mediated by a miRNA
212 (Agarwal et al., 2015; D. Kim et al., 2016), in accordance to our hypothesis.

213 Together, our results suggest that miR-16 modulates expression levels of two sets of
214 RNAs via direct base-pairing but the physiological relevance remains to be determined for
215 upregulated-miR-16-interactants.

216

217 **miR-16 controls uveal melanoma proliferation by targeting main pathways in uveal** 218 **melanoma**

219 Before exploring the role of these miR-16-interactants, we verified that they are not cell
220 line-restricted. Thus, using the same approach (synthetic miR-16 transfection), we validated 19
221 candidates in two others uveal melanoma cell line (Mel202 and 92-1) (Fig. 3A). We observed
222 a downregulation of our miR-16 targets in all cell lines except *MYB* in Mel202 cell line. We
223 confirmed these results in the HCT116 colon cell line, free of endogenous miR-16 due to the
224 DROSHA knock-out (Fig. 3B, S3A) (Kim et al., 2016). Among the expressed RNAs in this
225 colon model, we showed that synthetic miR-16 is able to promote the same RNA decay than
226 observed in uveal melanoma model. Together, these results suggest that the miR-16 targets
227 identified in MP41 cell line is highly conserved in the same cancer models (uveal melanoma)

228 despite the different driver mutations and chromosome abnormal copy number characterizing
229 these three cell lines. Moreover, the miR-16 interactome is, at least in part, common to other
230 models such as colon. Next, we investigated how miR-16 reduces melanoma cell proliferation
231 since no effective treatment are currently available for uveal melanoma at metastatic stage
232 (Jager et al., 2020). Even if we confirmed that miR-16 targets cell cycle regulators such as
233 *CCND1*, *CCND3* and *WEE1* (Fig. 2A, 2D), we investigated the biological consequences of the
234 RNA decay of less-known RNAs in uveal melanoma. Thus, we performed depletion of four
235 miR-16 targets (*AMOT*, *Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein 1*, *TACCI*;
236 *Nuclear receptor-binding protein*, *NRBP1*; *Dna J Heat Shock Protein Family Hsp40 Member*
237 *B4*, *DNAJB4*). We selected these candidates in function of the decreasing expression during the
238 kinetic experiment (Fig 3C, S3B) MRE-16s identified in their 3'UTR and the lack of a clear
239 connection between these RNAs and uveal melanoma. *AMOT* belongs to one of the most
240 important survival pathways in uveal melanoma; the YAP pathway. Previous studies
241 demonstrated that YAP depletion or inhibition of downstream targets strongly reduced tumor
242 growth in mice (Feng et al., 2014; Lyubasyuk et al., 2015). In accordance to the literature, we
243 confirmed that YAP protein decreased in presence of miR-16 in our melanoma model (Fig.
244 S3C). The depletion of *AMOT* by siRNA (Fig. S3D) decreased cell density in MP41, suggesting
245 that miR-16 abrogates cell proliferation/survival by targeting at least two actors of the YAP
246 pathway (*YAP* and *AMOT*). In addition, we confirmed that depletion of *TACCI* or *NRBP1* or
247 *DNAJB4* also reduced cell density of melanoma cells (Fig. 3C & S3D).

248 Together, our results suggested that miR-16 reduces melanoma cell proliferation by
249 targeting vital pathways/processes such as YAP pathway and cell cycle regulators (Fig 3D). It
250 is tempting to postulate that loss of miR-16 activity due to miR-16 sequestration could promote
251 cell proliferation by derepressing these miR-16 targets.

252

253 **Non-canonical miR-16 binding to miR-16-interactants promotes both RNA translation**
254 **and miR-16 sequestration**

255

256 Since the function of upregulated miR-16-interactants is poorly studied, we firstly
257 validated their expression levels increase in response to miR-16 transfection in other cell lines
258 (Mel202, 92-1 and HCT116 KO Drosha) as mentioned before for miR-16 targets (Fig. 2). For
259 the majority of tested RNAs, we validated their increase in response to miR-16 in at least
260 another cell line. Among them, some seem to be cell line specific (Fig 4A).

261 Next, we assessed the translational consequence of miR-16 binding on these
262 upregulated-miR-16-interactants since miRNA binding commonly provokes a translation
263 blockade and induces the RNA decay via seed base pairing (Bartel, 2004). Here, we focused
264 our attention on *PYGB*, defined as our best miR-16 sponge candidate due to its high expression
265 level in uveal melanoma (Fig. 2G) and its increase in response to miR-16 transfection in three
266 UM models and in HCT116 KO Drosha model (Fig. 4A & B). In accordance to the *PYGB*
267 mRNA increase, we showed by western-blot experiments that PYGB protein levels increased
268 in response to miR-16 transfection in three uveal melanoma cell lines (Fig. 4C, S4A). These
269 results demonstrate that miR-16 binding on *PYGB* mRNA promotes *in fine* the effector; the
270 PYGB protein, highlighting an unexpected role for miRNA in the regulation of gene expression.

271 To elucidate the molecular mechanism explaining the translation upregulation mediated
272 by miR-16, we looked for MRE-16 binding sites on *PYGB* mRNA using the webtool
273 RNAhybrid (Krüger & Rehmsmeier, 2006), which uses the energy needed to predict interaction
274 between two RNA. It forecasts 2 potential non-canonical miR-16 binding sites with high
275 energy. These sites have not been predicted by TargetScan 7.2, which predicts miRNA targets
276 based on the perfect sequence complementarity between the seed region of the miRNA and the
277 3'UTR of mRNA (Fig. 4D). To define the biological role of these two non-canonical miR-16

278 binding sites, we cloned these sequences (sites 1 or 2, wild-type or mutated (WT or MUT)) in
279 fusion with the luciferase coding sequence. The translation efficiency of these chimeric RNAs
280 is estimated by assessing the luciferase activity. As control, we used the luciferase coding
281 sequence fused to a canonical MRE-16 (from CCND1) (Fig. 4E). As attended (Bonci et al.,
282 2008), we found a decrease of luciferase activity in response to miR-16 transfection for this
283 canonical seed base pairing. In contrast, the non-canonical miR-16 binding sites promoted the
284 luciferase activity when compared to mutated sequences (Fig. 4F). These results strongly
285 suggested that miR-16 binds to these non-canonical MRE-16 to promote the translation rate
286 (and/or the chimeric RNA stability).

287 Altogether our results strongly suggest that the miRNA/RNA base-pairing determines
288 the effect on RNA stability and translation; a non-canonical MRE can promote the translation
289 in contrast to a canonical MRE.

290 Next, we further investigated the potential miR-16 sponge activity exerts by *PYGB* due
291 to its high expression level and its ability to bind two miR-16 per *PYGB* mRNA. We postulated
292 that the *PYGB* depletion may lead to the endogenous release of miR-16 docked on *PYGB*
293 mRNA, and the redirection of released miRNA promotes the canonical MRE-16 mRNA decay
294 (*AMOT*, *TACCI*, *NRBP1*, *DNAJB4* and *WEE1*). By RT-qPCR, we observed a slight decrease
295 of four of these five RNAs in response to *PYGB* depletion, suggesting that miR-16 could be
296 sequestered on miR-16 via non-canonical MRE-16 (Fig. 4G, 4H & S4B). Due to the modest
297 effect, we postulated that only a small part of miR-16 is sequestered on *PYGB* mRNA and the
298 miR-16 sequestration involves several RNAs with non-canonical MRE-16. This model of
299 sequestration may explain why we identified 57 potential miR-16 sponges in uveal melanoma
300 (Fig. 2C).

301

302

303 **miR-16 interactome predicts uveal melanoma metastasis and survival**

304 By defining the miR-16 interactome, our results strongly suggest that miR-16 is
305 sequestered on several miR-16 sponges on non-canonical MREs. This sequestration may
306 abolish the canonical activity of miR-16; the RNA decay of mRNAs involved in survival
307 pathway of uveal melanoma. Thus, we postulated that a high level of miR-16 sponges could be
308 associated with loss of miR-16 activity and consequently associated with a poor overall survival
309 of patients with uveal melanoma.

310 We demonstrated that the upregulated-miR-16-interactants (defined here as miR-16
311 sponges) quantification efficiently predicts the metastasis risk; reflecting the survival of uveal
312 melanoma patients (TCGA cohort, n=80) (Fig. 5A). Unsupervised gene expression analysis
313 identified 2 patients clusters: light and dark grey (Fig 5 A). These clusters are highly correlated
314 with ones defined in TCGA analysis. The light grey is correlated with the 1 and 2 clusters, and
315 the dark one is correlated with the 3 and 4 defined on every signature (DNA methylation,
316 miRNA, mRNA lncRNA and SCNA (subclonal somatic copy number alterations)). TCGA
317 cluster 1 and 2 are associated to disomy 3, lower metastatic risk (good prognostic), contrary to
318 3 and 4 associated with monosomy 3 (Fig 5 A) (Robertson et al., 2018). Interestingly, clusters
319 are independent to the expression levels of miR-16 (Fig 1 D; 5A; 5C S5A). Next, we analyzed
320 the survival of patients from these clusters. The light grey cluster is associated with a better
321 survival than observed for the dark grey cluster (Fig 5B). Altogether, these results indicate that
322 miR-16 sponge activity is a useful marker for clinicians in contrast to miR-16 expression (Fig.
323 5C). The prediction of the metastatic risk is crucial to predict the prognostic because ~50%
324 patients develop metastasis long-time after the primary diagnostic.

325 Since we postulated that canonical miR-16 activity is impaired by miR-16 sponges, the
326 miR-16 targets (downregulated-miR-16-interactants) as well as the miR-16 sponges

327 (upregulated-miR-16-interactants) could be used interchangeably to determine the metastatic
328 risk and the OS.

329 However, this list, reflecting miR-16 activity, contain too many RNAs to be exploited
330 by clinicians (57 RNAs). Thus, we looked for the most powerful RNAs to individually predict
331 the OS. We showed that *PTP4A3* is one of the most efficient RNA to predict the OS in this
332 TCGA cohort in accordance to previous study (Duciel et al., 2019) (Fig. 5D). The *PTP4A3* gene
333 maps to 8q24.3, which is frequently gained in uveal melanoma. However, authors demonstrated
334 that its overexpression expression level is associated to an increase of migration capability and
335 proliferation rate. This RNA, upregulated in 66% of biopsies, is not merely a consequence of
336 8q chromosome overrepresentation (Fig. S5B). Here, it is tempting to postulate that miR-16
337 may be involved in this *PTP4A3* mRNA upregulation in UM. In addition, *PRPF31*(*pre-mRNA*
338 *processing factor 31*) (Fig. 5D) encoding the splicing factor U4/U6 small nuclear
339 ribonucleoprotein Prp31, also predicts the OS as well as *PTP4A3*.

340 As attended, the downregulated-miR-16-interactants signature (n=327 RNAs) (Fig 2C)
341 also defines 2 clusters with the same association than previous presented with upregulated miR-
342 16-interactants. In accordance with our hypothesis, the Kaplan Meyer analysis showed that this
343 signature can also predict the prognostic (Fig. 5E, 5F).

344 In addition, derepressed mRNA such as *CHPT1* (Choline Phosphotransferase 1) also
345 predict the OS (Fig. 5G). These results confirmed that the upregulation of miR-16 sponges
346 (*PTP4A3*, *PRPF31*) are associated to a derepression of miR-16 targets (*CHPT1*).

347 Altogether, our results demonstrated that miR-16 binding on non-canonical MRE-16
348 promotes miR-16 sequestration and loss of the tumor suppressor activity of miR-16. The
349 determination of miR-16 activity using our RNA-signatures seems useful to predict the
350 metastasis risk and OS for patients with uveal melanoma.

351

352 **DISCUSSION**

353

354 Gene expression is fine-tuned by miRNAs at post-transcriptional level. Alteration of miRNA
355 expression or activity is associated with numerous diseases, suggesting that the quantification
356 of miRNA activity is crucial to estimate the role of miRNAs in cancer. Here, we demonstrated
357 that miRNA activity is measurable by defining the miRNA-interactome. We highlighted an
358 unexpected mechanism to explain the loss of miRNA activity associated to metastasis risk and
359 poor overall survival in uveal melanoma. The canonical activity (mRNA decay) of the tumor
360 suppressor miR-16 is impaired due to the sequestration of miR-16 on non-canonical MRE-16.
361 Sequestered, miR-16 is no more able to induce the decay of its canonical targets such as cell
362 cycle regulators (*CCND3*, *CCND1* and *WEE1*) and effectors of YAP pathway (*AMOT* & *YAP*)
363 to abrogate the cell proliferation and survival. We identified, by complementary experiments,
364 the miR-16 sponges (defined as upregulated-miR-16-interactants). Importantly, we showed that
365 non-canonical miR-16 binding on these mRNAs promote their accumulation. Further
366 experiments are needed to explain this phenomenon. It is tempting to propose that miR-16 on
367 non-canonical MRE-16 may recruit FXR1, which promotes the RNA circularization and a non-
368 canonical translation as demonstrated by Steitz's lab (Bukhari et al., 2016; Vasudevan et al.,
369 2007) . This mechanism could explain the mRNA upregulation in response to miR-16 binding
370 and the increase of protein observed for PYGB. In addition, this circularization may thus
371 increase the sponge activity of linear RNAs since the most potent miRNA sponges are probably
372 circRNAs (Guo et al., 2014). In accordance to this hypothesis, a recent study demonstrates that
373 miRNA loaded in Ago2 are enriched in 3'UTR of several RNAs without inducing their decay.
374 Authors clearly demonstrated that *MYC* RNA levels increased in response to miRNA binding
375 (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.25.956623v1>). Altogether, our results
376 suggest that non-canonical miR-16 activity led to gain-of-function of pro-tumoral genes such

377 as *PTP4A3*. This RNA is overexpressed in the majority of uveal melanoma and could be an
378 interesting target as therapy for uveal melanoma using antisense oligonucleotides, able to
379 promote the RNA degradation *in vivo*. Thus, we propose that miR-16 can exert pro- or anti-
380 tumoral activity in function of its base-pairing to RNAs.

381 Currently, the concept explaining the competition between RNAs to bind miRNA is still
382 matter of debate. Here, we showed that miR-16 sequestration is probably assumed by several
383 RNAs in uveal melanoma since the single *PYGB* knock-down induces a modest decay of miR-
384 16 targets. This is in accordance to the identification of 57 potential miR-16 sponges in uveal
385 melanoma. Our report highlights the importance of studying miRNA effect as a key player of
386 a complex RNAs network. Importantly, we confirmed the role on non-canonical miRNA
387 binding on miRNA sponge in another model using other methods (Gilot et al., 2017.; Migault
388 et al., 2017).

389 In conclusion, it could be interesting to update the current models explaining the
390 miRNA activity and the role of miRNA in gene regulation and diseases.

391

392

393

394

395 **ACKNOWLEDGEMENTS**

396

397 The authors thank the Gene Expression and Oncogenesis team from the CNRS UMR6290;
398 especially Sebastien Corre.

399

400 The authors acknowledge the SFR Biosit core facilities of Rennes 1 University with the, the
401 and the Human and Environmental Genomics platform for their help and support.

402

403 This study received financial support from the following: Fondation ARC pour la Recherche;
404 Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC); Départements du Grand-Ouest; Région Bretagne;
405 University of Rennes 1 ; CNRS; SFR Biosit,

406

407 Further support was provided by a “Ligue Nationale Contre le Cancer” (LNCC) fellowship and
408 French Ministry of Research (“Ministère français de l’Enseignement supérieur, de la Recherche
409 et de l’Innovation”) fellowship (AQ). The authors are grateful to Narry Kim for providing the
410 HCT KO Drosha and HCT166 WT (Korean Collection for Type Cultures (KCTC)) and to
411 Didier Decaudin for the MP41 cell line.

412

413 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

414 Conceptualization: AQ & DG.

415 Methodology: AQ, LB, MA, SA & DG.

416 Software: AQ, MA, SA & GS.

417 Formal analysis: AQ, LB, MA, DL & SA.

418 Investigation: AQ, LB, MA, DL, & DG.

419 Writing-original draft: AQ, LB & DG.

420 Visualization: AQ, LB, MA, SC, SA, GS, BM & DG.

421 Supervision: DG.

422 Project Administration: DG & MDG.

423 Funding: DG & MDG.

424

425 **DECLARATION OF INTERESTS**

426 Authors declare no conflict of interests.

427

428 **DATA AVAILABILITY**

429 ...On Going

430

431

432

433 **REFERENCES**

434 Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA
435 target sites in mammalian mRNAs. *ELife*, 4(AUGUST2015).

436 <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>

437 Amirouchene-Angelozzi, N., Nemati, F., Gentien, D., Nicolas, A., Dumont, A., Carita, G., ...

438 Roman-Roman, S. (2014). Establishment of novel cell lines recapitulating the genetic

439 landscape of uveal melanoma and preclinical validation of mTOR as a therapeutic target.

440 *Molecular Oncology*, 8(8), 1508–1520. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.06.004>

441 Aqeilan, R. I., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2010, February). MiR-15a and miR-16-1 in

442 cancer: Discovery, function and future perspectives. *Cell Death and Differentiation*, Vol.

443 17, pp. 215–220. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.69>

444 Bartel, D. P. (2004, January 23). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and

445 Function. *Cell*, Vol. 116, pp. 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)

446 Bartel, D. P. (2009, January 23). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions.
447 *Cell*, Vol. 136, pp. 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>

448 Bartel, D. P. (2018, March 22). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, Vol. 173, pp. 20–51.
449 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>

450 Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., ... De Maria,
451 R. (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple
452 oncogenic activities. *Nature Medicine*, *14*(11), 1271–1277.
453 <https://doi.org/10.1038/nm.1880>

454 Bottoni, A., Piccin, D., Tagliati, F., Luchin, A., Zatelli, M. C., & Uberti, E. C. D. (2005).
455 miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *Journal of Cellular*
456 *Physiology*, *204*(1), 280–285. <https://doi.org/10.1002/jcp.20282>

457 Bukhari, S. I. A., Truesdell, S. S., Lee, S., Kollu, S., Classon, A., Boukhali, M., ...
458 Vasudevan, S. (2016). A Specialized Mechanism of Translation Mediated by FXR1a-
459 Associated MicroRNP in Cellular Quiescence. *Molecular Cell*, *61*(5), 760–773.
460 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.013>

461 Cai, C. K., Zhao, G. Y., Tian, L. Y., Liu, L., Yan, K., Ma, Y. L., ... Ma, B. A. (2012). miR-
462 15a and miR-16-1 downregulate CCND1 and induce apoptosis and cell cycle arrest in
463 osteosarcoma. *Oncology Reports*, *28*(5), 1764–1770.
464 <https://doi.org/10.3892/or.2012.1995>

465 Calin, G. A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Shimizu, M., ... Croce, C.
466 M. (2008). MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of*
467 *the National Academy of Sciences*, *105*(13), 5166–5171.
468 <https://doi.org/10.1073/pnas.0800121105>

469 Calin, George Adrian, Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., ... Croce,

470 C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and
471 miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy*
472 *of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529.
473 <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>

474 Corre, S., Tardif, N., Mouchet, N., Leclair, H. M., Boussemart, L., Gautron, A., ... Galibert,
475 M. D. (2018). Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor
476 promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma. *Nature Communications*, 9(1).
477 <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06951-2>

478 Dash, S., Balasubramaniam, M., Dash, C., & Pandhare, J. (2018). Biotin-based Pulldown
479 Assay to Validate mRNA Targets of Cellular miRNAs. *Journal of Visualized*
480 *Experiments*, (136). <https://doi.org/10.3791/57786>

481 Duciel, L., Anezo, O., Mandal, K., Laurent, C., Planque, N., Coquelle, F. M., ... Saule, S.
482 (2019). Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3/PRL-3) promotes the aggressiveness
483 of human uveal melanoma through dephosphorylation of CRMP2. *Scientific Reports*,
484 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39643-y>

485 Feng, X., Degese, M. S., Iglesias-Bartolome, R., Vaque, J. P., Molinolo, A. A., Rodrigues,
486 M., ... Gutkind, J. S. (2014). Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal
487 melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer*
488 *Cell*, 25(6), 831–845. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.016>

489 Gilot, D., Migault, M., Bachelot, L., Journée, F., Rogiers, A., Donnou-Fournet, E., ... Galibert,
490 M.-D. (n.d.). *A non-coding function of TYRP1 mRNA promotes melanoma growth*.
491 <https://doi.org/10.1038/ncb3623>

492 Grosswendt, S., Filipchyk, A., Manzano, M., Klironomos, F., Schilling, M., Herzog, M., ...
493 Rajewsky, N. (2014). Unambiguous Identification of miRNA: Target site interactions by
494 different types of ligation reactions. *Molecular Cell*, 54(6), 1042–1054.

495 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.049>

496 Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., & Bartel, D. P. (2014). Expanded identification and
497 characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*, *15*(7), 409.
498 <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0409-z>

499 Hanniford, D., Ulloa-Morales, A., Karz, A., Berzoti-Coelho, M. G., Moubarak, R. S.,
500 Sánchez-Sendra, B., ... Hernando, E. (2020). Epigenetic Silencing of CDR1as Drives
501 IGF2BP3-Mediated Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancer Cell*, *37*(1), 55-70.e15.
502 <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.007>

503 Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., &
504 Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*,
505 *495*(7441), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature11993>

506 Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., & Tollervey, D. (2013). Mapping the human miRNA
507 interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell*, *153*(3), 654–665.
508 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.043>

509 Jager, M. J., Magner, J. A. B., Ksander, B. R., & Dubovy, S. R. (2016, August 1). Uveal
510 Melanoma Cell Lines: Where do they come from? (An American Ophthalmological
511 Society Thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, Vol. 114, p.
512 T5. American Ophthalmological Society.

513 Jager, M. J., Shields, C. L., Cebulla, C. M., Abdel-Rahman, M. H., Grossniklaus, H. E., Stern,
514 M.-H., ... Damato, B. E. (2020). Uveal melanoma. *Nature Reviews. Disease Primers*,
515 *6*(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0158-0>

516 Kim, D., Sung, Y. M., Park, J., Kim, S., Kim, J., Park, J., ... Baek, D. (2016). General rules
517 for functional microRNA targeting. *Nature Genetics*, *48*(12), 1517–1526.
518 <https://doi.org/10.1038/ng.3694>

519 Kim, Y. K., Kim, B., & Kim, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin

520 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of*
521 *Sciences of the United States of America*, 113(13), E1881–E1889.
522 <https://doi.org/10.1073/pnas.1602532113>

523 Kleaveland, B., Shi, C. Y., Stefano, J., & Bartel, D. P. (2018). A Network of Noncoding
524 Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain. *Cell*, 174(2), 350–362.e17.
525 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.022>

526 Konno, M., Koseki, J., Asai, A., Yamagata, A., Shimamura, T., Motooka, D., ... Ishii, H.
527 (2019). Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers.
528 *Nature Communications*, 10(1), 3888–3888. [https://doi.org/10.1038/s41467-019-11826-](https://doi.org/10.1038/s41467-019-11826-1)
529 1

530 Krüger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: MicroRNA target prediction easy, fast
531 and flexible. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.).
532 <https://doi.org/10.1093/nar/gkl243>

533 Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel
534 genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853–858.
535 <https://doi.org/10.1126/science.1064921>

536 Lal, A., Thomas, M. P., Altschuler, G., Navarro, F., O'Day, E., Li, X. L., ... Lieberman, J.
537 (2011). Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a
538 as a regulator of growth factor signaling. *PLoS Genetics*, 7(11).
539 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002363>

540 Lezina, L., Purmessur, N., Antonov, A. V., Ivanova, T., Karpova, E., Krishan, K., ... Barlev,
541 N. A. (2013). MiR-16 and miR-26a target checkpoint kinases Wee1 and Chk1 in
542 response to p53 activation by genotoxic stress. *Cell Death and Disease*, 4(12), e953.
543 <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.483>

544 Liu, Q., Fu, H., Sun, F., Zhang, H., Tie, Y., Zhu, J., ... Zheng, X. (2008). miR-16 family

545 induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Research*,
546 36(16), 5391–5404. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn522>

547 Liu, T., Ortiz, J. A., Taing, L., Meyer, C. A., Lee, B., Zhang, Y., ... Liu, X. S. (2011).
548 Cistrome: An integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome*
549 *Biology*, 12(8), R83. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-8-r83>

550 Loeb, G. B., Khan, A. A., Canner, D., Hiatt, J. B., Shendure, J., Darnell, R. B., ... Rudensky,
551 A. Y. (2012). Transcriptome-wide miR-155 Binding Map Reveals Widespread
552 Noncanonical MicroRNA Targeting. *Molecular Cell*, 48(5), 760–770.
553 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.002>

554 Luna, J. M., Scheel, T. K. H., Danino, T., Shaw, K. S., Mele, A., Fak, J. J., ... Darnell, R. B.
555 (2015). Hepatitis C Virus RNA Functionally Sequesters miR-122. *Cell*, 160(6), 1099–
556 1110. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.025>

557 Lyubasyuk, V., Ouyang, H., Yu, F. X., Guan, K. L., & Zhang, K. (2015). YAP inhibition
558 blocks uveal melanogenesis driven by GNAQ or GNA11 mutations. *Molecular and*
559 *Cellular Oncology*, 2(1). <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.970957>

560 Migault, M., Donnou-Fournet, E., Galibert, M.-D., & Gilot, D. (2017). Definition and
561 identification of small RNA sponges: Focus on miRNA sequestration. *Methods*, 117, 35–
562 47. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.012>

563 Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., ... Dreyfuss, G.
564 (2002). miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs.
565 *Genes and Development*, 16(6), 720–728. <https://doi.org/10.1101/gad.974702>

566 Robertson, A. G., Shih, J., Yau, C., Gibb, E. A., Oba, J., Mungall, K. L., ... Woodman, S. E.
567 (2018). Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical. *Cancer Cell*, 33(1),
568 151. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.12.013>

569 Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011, August 5). A ceRNA

570 hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell*, Vol. 146, pp. 353–358.

571 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>

572 Tan, S. M., & Lieberman, J. (2016). Capture and identification of mirna targets by biotin

573 pulldown and RNA-seq. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1358, pp. 211–228).

574 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3067-8_13

575 Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation:

576 MicroRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858), 1931–1934.

577 <https://doi.org/10.1126/science.1149460>

578

579

580

581 **FIGURES LEGENDS**

582

583 **Figure 1 miR-16 is a potent tumor suppressor in uveal melanoma**

584

585 (A) Schematic representation of the genomic loci of miR-16 (MIR16-1 & MIR16-2) and miR-
586 16 precursors: pri- & pre-miR-16 (1 &2) and miR-16.

587

588 (B) Schematic representation of the expected amount of miR-16 according to the chromosomal
589 status for the two miR-16 loci, for both leukemia and uveal melanoma patients; (CLL:
590 Chronic Lymphocytic Leukemia).

591

592 (C) pri-miR-16-1 and mature miR-16 expression in leukemia patients according to the status of
593 chromosome 13; Del: deletion (n=3); WT: Wild Type (n=2). Description of chromosomal
594 abnormalities are available in supplementary figure 1, Each histogram represents the mean
595 \pm s.d.

596

597

598 (D) miR-16 expression according to the status of the chromosome 3 for uveal melanoma
599 patients from the TCGA cohort (expressed in count per million (CPM)) monosomy patients
600 n= 37 and disomy patient n=42. Each histogram represents the mean \pm s.d

601

602 (E) Quantification of miR-16 expression in three uveal melanoma cell line (MP41, Mel202, 92-
603 1) by RT-qPCR compare to cutaneous melanoma cell line (501Mel). The absolute
604 quantification (copy number) of miR-16 in 501Mel was determined by Northern-blot in
605 (Gilot et al., 2017). The status of the chromosome 3 of each uveal melanoma cell line was
606 determined by Amirouchene and colleagues (Amirouchene-Angelozzi et al., 2014). n= 3
607 biologically independent experiments for each cell line. Each histogram represents the mean
608 \pm s.d.

609

610 (F) Cell density of MP41, Mel202 and 92-1 (n=4, 5 and 5 biologically independent
611 experiments, respectively) in response to the miR-16 overexpression (transfection of
612 synthetic miR-16 *versus* miR-CTR), 72h after transfection. Each histogram represents the
613 mean \pm s.d.; Bilateral Student test (with non-equivalent variances) **p<0;01; ***p<0,001.

614
615 (G)MP41 dead cells percentage (apoptosis + necrosis; in % relative to miRNA control) in
616 response to the miR-16 overexpression, 72h after transfection, (n=3 biologically
617 independent experiments); Each histogram represents the mean \pm s.d.; Bilateral Student test
618 (with non-equivalent variances) **p<0,01.

619

620 **Figure 2: miR-16 interactome**

621

622 (A) Heatmap representing the differential transcriptomic response induced by transfection of
623 miR-16 *versus* miR-CTR in MP41 cell line (0h= start time point, 6h, 12h, 24h, 48h post
624 transfection). MP41 transcriptome (n=14,842 genes) are divided in three populations. By
625 comparing miR-16 condition *versus* miR-CTR at early time point (6h-12h) and late time (24h-
626 48h) three populations are identified: stable genes ~88%, downregulated (LogFC<-0,5) genes
627 ~5% and upregulated (LogFC>0,5) genes ~7%. Left heatmap illustrating the down-regulation
628 of genes, analyzed by RNAseq, after miR-16 transfection in MP41 at different time points of
629 the kinetic (0h, 6h, 12h, 24h, 48h). Right heatmap illustrating the up-regulation of genes.

630

631 (B) Schematic representation of the workflow. The kinetic experiment identified 2 RNA
632 populations: downregulated and upregulated RNAs. MiR-16 pulldown (performed using
633 biotinylated miR-16 *versus* biotinylated miR-CTR followed by RNAseq analysis) identified
634 directs partners among down- and up- regulated RNAs. It defines the miR-16 interactome.-

635

636 (C) Graph a: Representation of pulldown enrichment (miR-16 – miR-CTR) in function of
637 the transcriptomic expression changes (Fold change (FC) expression after miR-16 exposure).
638 Two clusters are delimited. The cluster b, in blue, corresponds to RNAs with : an enrichment
639 >100 and down regulated with a fold change < -0,5 (n=476 genes). The cluster c in red,
640 corresponds to RNAs with : an enrichment >100 and up regulated with a fold change >0,5
641 (n=497 genes).

642

643 Graph b': represents same genes of the graph b without those suspected to be false
644 positive due to their detection with biotinylated miR-CTR (threshold 500 reads in the RNAseq,
645 for miR-CTR) (n=327 genes).

646

647 Graph c': represents same genes of the graph c without those suspected to be false
648 positive due to their detection with biotinylated miR-CTR (threshold 500 reads in the RNAseq
649 for miR-CTR) (n=403 genes).

650

651 Graph c'' in grey: is the same selected genes of the graph c' but they are represented
652 according to their basal expression by pulldown enrichment (miR-16 – miR-CTR). The c'''
653 cluster represents only genes with a basal expression >10 (normalized expression).

654

655 Blue ones are related to miR-16 targets, and red ones are related to miR-16 upregulated miR-
656 16 interactants.

657

658 (D) Downregulated RNAs are organized according to the level of the downregulation at the late
659 timepoint. Only the top 30 are represented. Blue ones harbor at least one canonical MRE-16
660 predicted by TargetScan 7.2.

661

662 (E) Pie chart represents the percentage of RNAs harboring at least one MRE-16 predicted by
663 TargetScan in downregulated RNAs (from selected ones in graph b' (Fig. 2C) in blue (n=327)).

664

665 (F) Logos of miRNA binding site motifs enriched in cluster down regulated RNAs after miRNA
666 pulldown in MP41 (analyzed by Cistrome SeqPos (T. Liu et al., 2011))

667

668 (G) Basal expression of the 30 most expressed genes at the basal level (from the selected genes
669 represents in the graph c''' (Fig. 2C)). Red ones harbor at least one canonical MRE-16 predicted
670 by TargetScan 7.2.

671

672 (H) Pie chart represents the percentage of RNAs harboring a MRE-16 predicted by TargetScan
673 7.2 in upregulated RNAs (from graph c''' (Fig. 2C) in red (n=57))

674

675 (I) Pie chart represents the percentage of RNAs harboring a MRE-16 predicted by TargetScan
676 7.2 in the entire MP41 transcriptome, in white (n=15,040)

677

678

679

680

681 **Figure 3: miR-16 targets in uveal melanoma**

682

683 (A) mRNA expression levels of selected miR-16 targets, 72h after transfection of miR-16
684 relative to miR-CTR in MP41, Mel202 and 92-1 (n=3, 4, 3 biologically independent
685 experiments, respectively) Each histogram represents the mean \pm s.d.; Bilateral Student test
686 (with non-equivalent variances) *p<0,05; **p<0;01; ***p<0,001.

687

688 (B) mRNA expression levels of selected miR-16 targets, 72h after transfection of miR-16
689 relative to miR-CTR in HCT 116 KO Drosha (n=3 biologically independent experiments). Each
690 histogram represents the mean \pm s.d.; Bilateral Student test (with non-equivalent variances)
691 **p<0,01; ***p<0,001.

692

693 (C) Cell density of MP41 cells in response to the depletion of *TACCI*, *AMOT*, *NRBP1*, *DNAJB4*
694 by two different siRNA (#1 and #2) relative to siCTR, (n=4, biologically independent
695 experiments) 72h after transfection. Each histogram represents the mean \pm s.d.; Bilateral
696 Student test (with non-equivalent variances) *p<0,05; **p<0;01; ***p<0,001.

697

698 (D) Schematic representation of miR-16 targets and phenotypic consequences.

699

700 **Figure 4: miR-16 activity is impaired by non-canonical miR-16 binding**

701

702 (A) mRNA expression levels of selected miR-16 targets, 72h after transfection of synthetic
703 miR-16 relative to miR-CTR in MP41, Mel202 and 92-1 (n=3, 4, 3 biologically independent
704 experiments respectively) Each histogram represents the mean \pm s.d.; Bilateral Student test
705 (with non-equivalent variances) *p<0,05; **p<0;01; ***p<0,001; †: Not detected genes.

706

707 (B) mRNA expression levels of selected miR-16 targets 72h after transfection of synthetic miR-
708 16 relative to miR-CTR in HCT 116 KO Drosha n=3 biologically independent experiments
709 Each histogram represents the mean \pm s.d.; Bilateral Student test (with non-equivalent
710 variances) *p<0,05; **p<0;01; †: Non-detected genes.

711

712 (C) Protein expression levels of PYGB in MP41, Mel202 and 92-1 cell lines in response to
713 miRNA transfection (72h, miR-CTR *versus* miR-16). The picture is representative of n=3, 2, 3
714 biologically independent experiments, respectively.

715

716 (D) schematic representation of the 3'UTR of *PYGB* mRNA containing two non-canonical
717 MRE.

718

719 (E) Biological function of non-canonical MRE-16. On the left side: predicted base-pairing
720 between *PYGB* mRNA and miR-16 using RNAHybrid (Krüger & Rehmsmeier, 2006). Base-
721 pairing has been evaluated for wild-type (WT) or mutated (MUT) MRE-16 (motif #1 and 2).
722 On the right side: schematic representation of the luciferase assay. These two non-canonical
723 miR-16 binding sites have been cloned in fusion with the luciferase coding sequence. The
724 translation efficiency of these chimeric RNAs is estimated by assessing the luciferase activity.

725

726 (F) Luciferase assay measuring the effect of synthetic miR-16 on these chimeric RNAs in
727 HCT116 KO Droscha cell line. MUT: mutated; WT: wild type (n= 5 biologically independent
728 experiments). Canonical MRE-16 (from *CCND1*, (Q. Liu et al., 2008)) has been used as
729 positive control (miR-16 induced the decay of a mRNA harboring a canonical MRE-16). Each
730 histogram represents the mean \pm s.d.; Bilateral Student test (with non-equivalent variances)
731 *p<0,05.

732

733 (G) mRNA expression levels of *AMOT*, *TACCI*, *NRBP1*, *DNAJB4* and *WEE1* in response to
734 *PYGB* mRNA depletion in MP41 (sh*PYGB* relative to shCTR, (n=3 biologically independent
735 experiments each) Each histogram represents the mean \pm s.d.; Bilateral Student test (with non-
736 equivalent variances) *p<0,05; **p<0;01.

737

738 (H) schematic representation of the hypothesis.

739

740 **Figure 5 : miR-16 availability defines two signatures that predict the pronostic of uveal**
741 **melanoma patients**

742

743 (A) Heatmap depicting the expression levels of sponge RNAs (upregulated miR-16
744 interactants) from the TCGA cohort of uveal melanoma.

745

746 (B) Determination of overall survival curves by Kaplan–Meier analysis estimates of overall
747 survival after subdivision into cluster light grey and dark grey expression groups (below or
748 above median expression of the gene). The size and the median survival of each group (with

749 95% CI) are specified. The difference in survival between groups is also reported (log-rank test
750 p-value). mo: months.

751

752 (C) Boxplot representing the amount of miR-16 according to the metastasis status.

753

754 (D) Kaplan–Meier estimates of overall survival after subdivision into low (blue) and high (red)
755 expression groups (below or above median expression of the gene). The size and the median
756 survival of each group (with 95% CI) are specified. The difference in survival between groups
757 is also reported (log-rank test p-value). mo: months.

758

759

760 (E) Heatmap depicting the expression levels of targets RNAs (downregulated miR-16
761 interactants) from the TCGA cohort of uveal melanoma.

762

763 (F) Determination of overall survival curves by Kaplan–Meier analysis estimates of overall
764 survival after subdivision into cluster light grey and dark grey expression groups (below or
765 above median expression of the gene). The size and the median survival of each group (with
766 95% CI) are specified. The difference in survival between groups is also reported (log-rank test
767 p-value). mo: months.

768

769 (G) Kaplan–Meier estimates of overall survival after subdivision into low (blue) and high (red)
770 expression groups (below or above median expression of the gene). The size and the median
771 survival of each group (with 95% CI) are specified. The difference in survival between groups
772 is also reported (log-rank test p-value). mo: months.

773

774 **Figure Sup 1:**

775

776 (A) Table of cytogenetic features of the chromosome 13 in patients

777

778 (B) Correlation analysis between miR-16-1 and miR-16-2 expression in patients (TCGA
779 cohort, uveal melanoma).

780

781 (C) Percentage of dead cell (apoptosis and necrosis) in response to miR-16 transfection into 92-
782 1 cells (72h after transfection, (n=3 biologically independent experiments)).

783

784

785 **Figure Sup 2**

786

787 (A) Basal expression levels of the most downregulated RNAs represented on the figure 2F.
788 Blue ones harbor at least one canonical MRE-16 predicted by Targetscan 7.2.

789

790 (B) Pie chart represents the percentage of RNAs harboring a MRE-16 predicted by TargetScan
791 7.2 in downregulated RNAs, of selected RNAs in Graphic b (Fig 2C) in blue (n=476)

792

793 (C) Logos of miRNA binding site motifs enriched in cluster of upregulated miR-16 interactants
794 after miR-16 pulldown in MP41. Analyzes were performed using Cistrome SeqPos

795

796 **Figure Sup 3:**

797

798 (A) Relative expression levels of miR-16 in HCT 116 WT and HCT 166 KO Droscha assessed
799 by RT qPCR (n=2 biologically independent experiments).

800

801 (B) part of the figure 2A; heatmap illustrating the selected genes of the figure 3A, analyzed by
802 RNAseq, after miR-16 transfection in MP41 at different time points of the kinetic (0h, 6h, 12h,
803 24h, 48h).

804

805 (C) Protein expression levels of a miR-16 target; YAP in MP41, Mel202 and 92-1 cell lines in
806 response to miR-CTR *versus* miR-16. The picture is representative of 3 biologically
807 independent experiments.

808

809 (D) Depletion of *AMOT*, *TACCC1*, *NRBP1*, and *DNAJB4* RNAs by two different siRNA (#1 and
810 #2). Expression relative to siCTR, quantified by RT-qPCR 72h after transfection, *P<0,05;
811 **P<0;01; ***P<0,001

812

813

814 **Figure Sup 4:**

815 (A) Expression levels of PYGB protein in response to miR-16 transfection (72h). n=2. Each
816 histogram represents the mean \pm s.d

817

818 (B) *PYGB* depletion in MP41 and 92-1 cell lines assessed by RT-qPCR n=3 Biologically
819 independant samples

820

821 **Figure Sup 5:**

822

823 (A) Determination of overall survival curves by Kaplan–Meier analysis estimates of overall
824 survival after subdivision into cluster light grey and dark grey expression groups (below or
825 above median expression of the gene). The size and the median survival of each group (with
826 95% CI) are specified. The difference in survival between groups is also reported (log-rank test
827 p-value). mo: months.

828

829 (B) Genetic alterations described in the TCGA cohort of uveal melanoma from Cbioportal.

830 *GNAQ*, *GNA11*, *BAP1*, *CYSLTR2* and *PLCB4* and *EIF1AX* were used as controls.

831

832

833

834

835
836
837
838

EXPERIMENTAL PROCEDURES

839
840

Cell Lines and Culture Conditions

841

842 MP41 cell line was obtained from Decaudin's lab at Curie Institute, Paris, France. Mel202 and
843 92.1 cell line were obtained from European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)
844 (Merck). 501Mel cell line were obtained from American Type Culture Collection (ATCC).
845 HCT WT and KO DROSHA cell lines were obtained from Korean Collection for Type Cultures
846 (KCTC), Microbial Resource Center. All cell lines were maintained in humidified air (37°C,
847 5% CO₂). Uveal melanoma cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Gibco™,
848 ThermoFisher, MA) supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (EurobioScientific)
849 and 1% Penicillin-Streptomycin (PS) antibiotics (Gibco™, ThermoFisher). 501Mel were
850 maintained in RPMI-1640 medium (Gibco™, ThermoFisher) supplemented with 10% Fetal
851 Bovine Serum (FBS) (EurobioScientific) and 1% Penicillin-Streptomycin (PS) antibiotics
852 (Gibco™, ThermoFisher). HCT116 cell lines were maintained in McCoy's 5A (Gibco™,
853 ThermoFisher) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (EurobioScientific) and 1%
854 Penicillin-Streptomycin (PS) antibiotics (Gibco™, ThermoFisher). All cell lines have been
855 routinely tested for mycoplasma contamination (Mycoplasma contamination detection kit; rep-
856 pt1; InvivoGen).

857

siRNAs and miRNA transfection

859 Sequences are available in Supplementary Table All siRNAs and synthetic mimics were
860 transfected at 66nM using Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) according to
861 manufacturer's instructions. For cell density assay: 80,000 cells for 92-1 and HCT116 KO

862 Droscha, HCT116 WT and 10,000 for MP41 and ; 12,000 for 92-1 cells were seeded in 96-well
863 plates, in quadruplicates. For RNA and proteins analysis, 250,000 cells were seeded in 6-well
864 plates. Cells were harvested 72h after transfection (or kinetic). All siRNAs were purchased
865 from IDT DNA. All mimics were purchased from Dharmacon.

866 shRNA experiments

867 Lentiviral particles carrying shRNA vectors targeting human *PYGB* mRNA (shPYGB,
868 TL310025V), and scramble shRNA (shCTR, TR30021V) were purchased from Origen.
869 Lentiviral production was performed as recommended (<http://tronolab.epfl.ch>) using HEK
870 293T cells. After infection, cells were maintained in the presence of puromycin 1 µg/ml for
871 selection (Invivogen).

872 RNA and miRNA isolation, Reverse Transcription, quantitative PCR

873
874 RNA was isolated from cell samples using NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel) and
875 quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Reverse
876 transcription was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied
877 Biosystems). Quantitative PCR was performed on 1 ng cDNA, in 384-well plates using the
878 SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with the QuantStudio™ 7 Flex Real-
879 Time PCR System (Applied Biosystems). RNA levels were normalized against human
880 *GAPDH*. Relative amounts of transcripts were determined using the $\Delta\Delta - Ct$ method and human
881 *GAPDH* transcript level was used as an internal control for each cell line sample.

882
883 MicroRNA was isolated using mirVana™ miRNA isolation kit (Ambion, Life Technologies,).
884 Reverse transcription was performed with the TaqMan microRNA Reverse Transcription kit
885 (Applied Biosystems) with the Megaplex RT Primers Pool A v2.1 (Applied Biosystems).

886 Quantitative PCR was performed on 2.5 ng cDNA, in 384-well plates using the TaqMan™
887 Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) with the QuantStudio™
888 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Relative amounts of
889 transcripts were determined using the $\Delta\Delta - Ct$ method and human RNU6B was used as an
890 internal control for each cell line sample. The primers were used are described in Table ...

891

892 Cell-density evaluation

893 Cell density was measured by methylene blue colorimetric assay (Gilot et al., 2017.). Briefly,
894 cells were fixed for 30 min with 70% ethanol. Then, fixed cells were dried and stained 30 min
895 with 1% methylene blue dye in borate buffer. Plates were washed 3 times with fresh tap water
896 and 100 μ l of 0.1N HCl per well were added. Plates were analyzed with a spectrophotometer
897 at 620nm.

898 Western-blot experiments

899 Experiments were performed as previously described (Gilot et al., 2017). Membranes (GE
900 HealthCare, Chicago, IL) were probed with suitable antibodies and signals were detected using
901 the LAS-3000 Imager (Fuji Photo Film). The primary and secondary antibodies are described
902 in Table .

903

904 RNA sequencing

905 Total RNAs were quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)
906 and RNA integrity (RIN > 8) was evaluated using RNA nano-chips on the Agilent 2100
907 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies). Libraries generation and sequencing
908 experiments have been conducted as previously reported (Corre et al., 2018).

909

910

911 Biotinylated miRNA pull down

912 These experiments were performed on MP41 cell according to the protocol published by Judy
913 Lieberman's lab (Tan & Lieberman, 2016) but with minor modifications. 15 millions of MP41
914 cells were seeded in 3 X 150mm dishes (5 millions each) and were transfected the next day with
915 100nM of biotinylated miR-16 or miR-CTR (Dharmacon). Next, they were harvested ~24h post
916 transfection and cells from the 3 dishes were pooled in the same pellet. Meanwhile, magnetic
917 beads (Streptavidine Dynabeads™ M-280 DYNAL™, ThermoFisher Scientific) were washed
918 and blocked according to the protocol (Tan & Lieberman, 2016). Cell lysate and washed beads
919 were incubated for 4 hours at 4°C on a rotating agitator. All next steps: the precipitation and
920 the purification of coupled RNA was performed according to the protocol. Purified RNA was
921 quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher
922 Scientific) followed by the sequencing.

923

924 Biotinylated miRNA pull down sequencing

925 RNA sequencing of pull downed RNA has been done by Novogene according to its RIP
926 sequencing protocol (Illumina PE150/Q30≥80%).

927

928 In silico analyses

929 The miRNA binding sites on RNA (MRE) were predicted by webtool TargetScan 7.2 (Agarwal
930 et al., 2015) and RNAhybrid (Krüger & Rehmsmeier, 2006) both available online. Non-
931 canonical MREs have been identified using Cistrome SeqPos motif analysis (T. Liu et al., 2011)
932 To assess the survival prognosis capabilities of the (selected genes ou sponges/targets), we
933 performed univariate Cox analyses of the expression data for these genes, with overall survival
934 (OS) as a dependent variable. Patients were divided into two categories according to the median
935 expression of each gene: low expression (below median) and high expression (above median).

936 The Kaplan–Meier method was used to estimate the survival distributions. Log-rank tests were
937 used to test the difference between survival groups. Analyses were carried out with the survival
938 R package.

939

940 Statistics and reproducibility

941 Data are presented as mean \pm s.d. unless otherwise specified, and differences were considered
942 significant at a P value of less than 0.05. Comparisons were performed using Bilateral Student
943 test (with non-equivalent variances). All statistical analyses were performed using Prism 8
944 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) or Microsoft Excel software

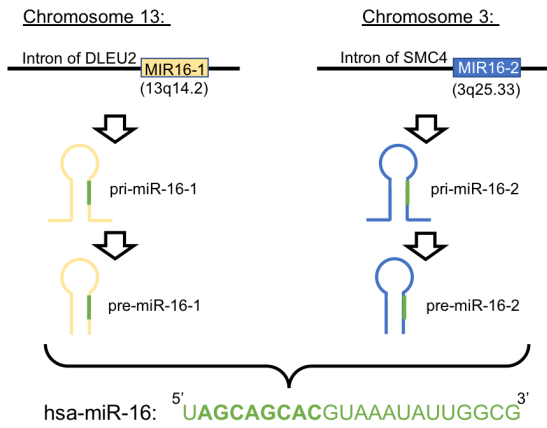
945 Overall survival was estimated using the Kaplan–Meier method. Univariate analysis using the
946 Cox regression model or log-rank test, as specified, was performed to estimate hazard ratios
947 (HRs) and 95% confidence intervals (CIs). All experiments were performed three or more times
948 independently under similar conditions, unless otherwise specified in the figure legends

949

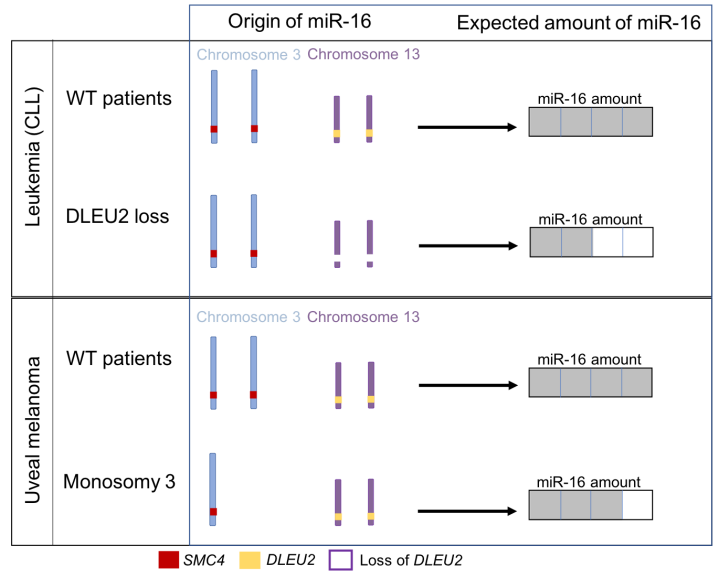
950 Data availability

951 mRNAseq and RIPseq data that support the findings of this study have been deposited in the
952 Gene Expression Omnibus (GEO) under accession codes XXXXXXXX and XXXXXXXX,
953 respectively. The human melanoma data set (uveal melanoma, IlluminaHiSeq) was derived
954 from the TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov>. The data set derived from
955 this resource that supports the findings of this study is available at [https://genome-](https://genome-cancer.ucsc.edu)
956 [cancer.ucsc.edu](https://genome-cancer.ucsc.edu). All other data supporting the findings of this study are available from the
957 corresponding author on reasonable request.

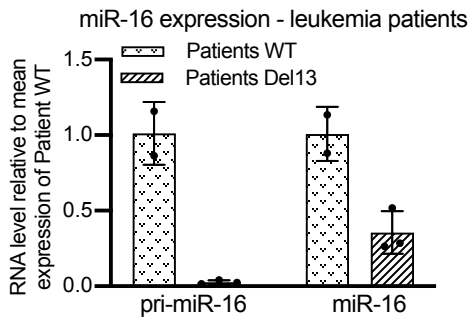
A



B

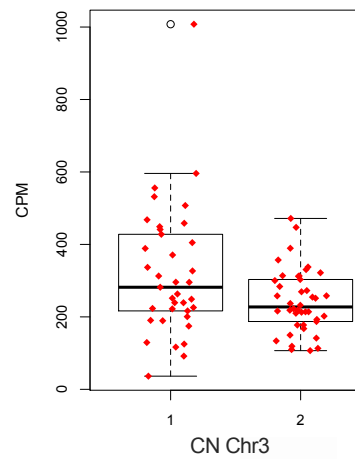


C

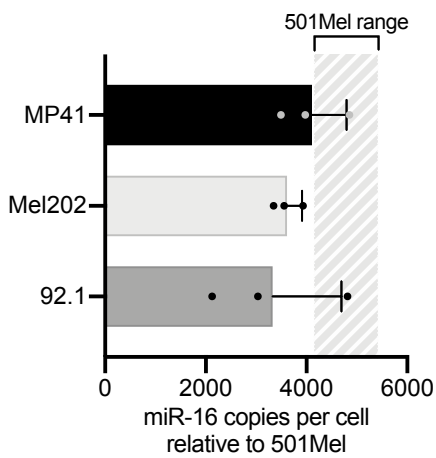


D

TCGA - miR-16 uveal melanoma

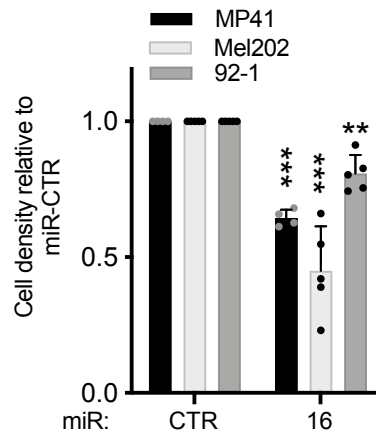


E



Cell lines	Chromosome 3 statut
MP41	Loss of 3
Mel202	Disomy
92.1	Disomy

F



G

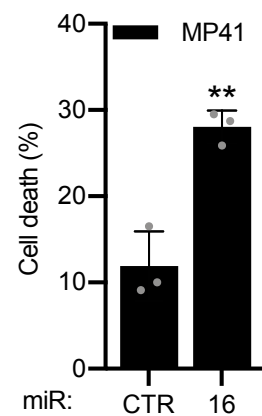


Figure 1: miR-16 is a potent tumor suppressor in uveal melanoma

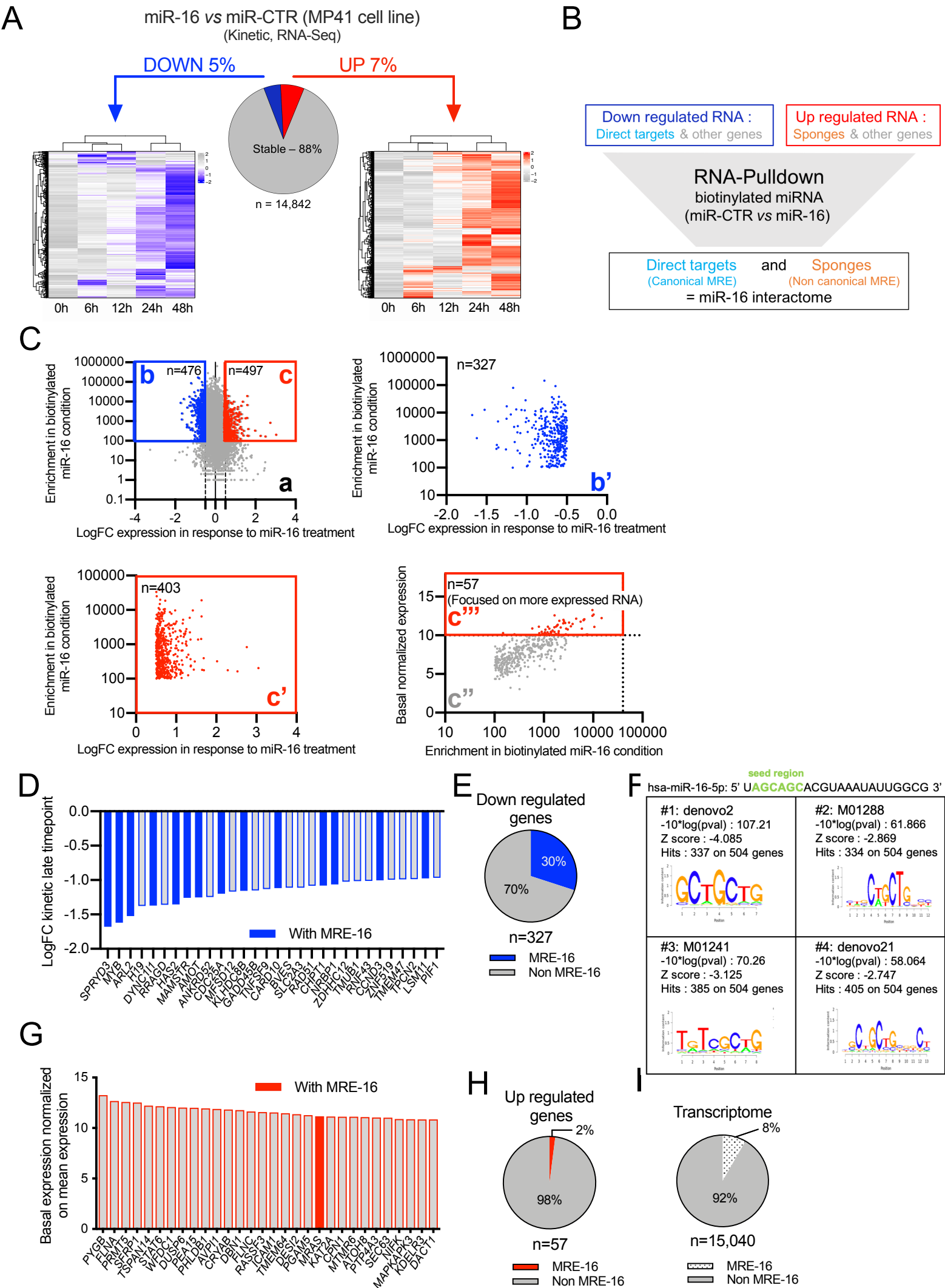


Figure 2: miR-16 interactome

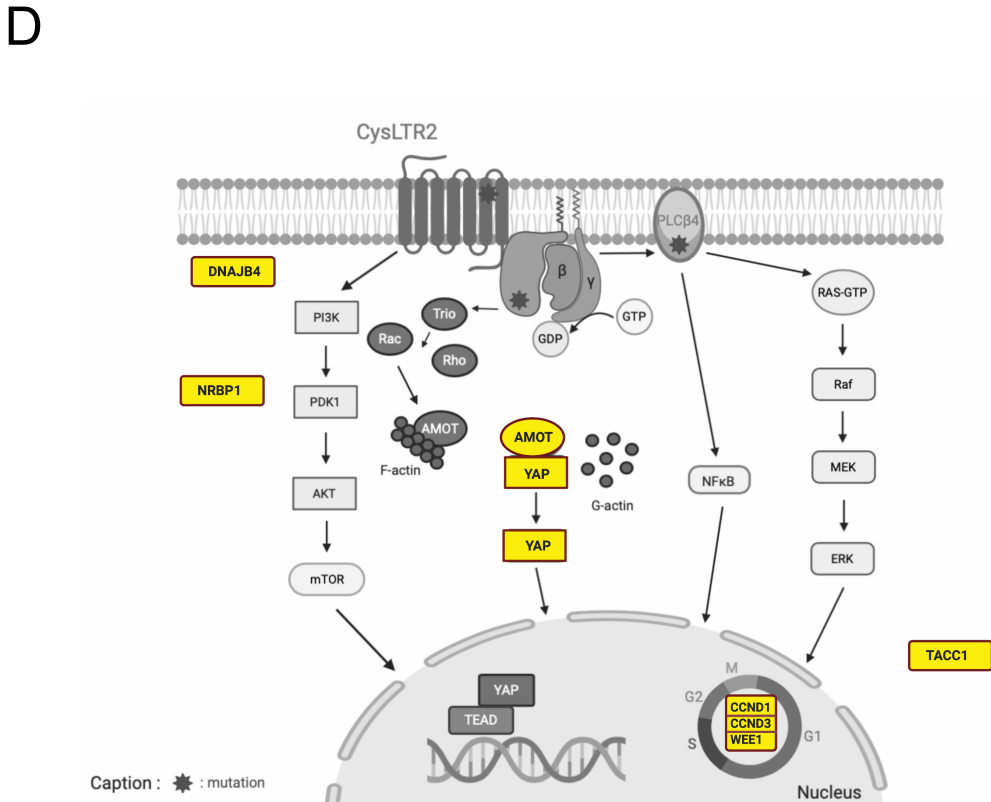
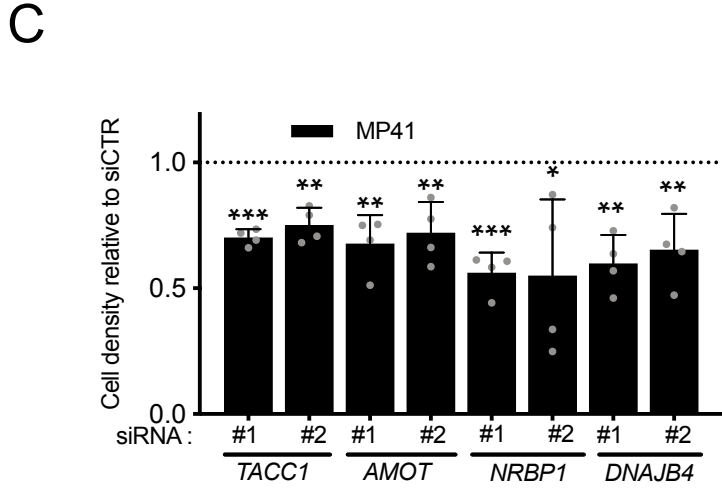
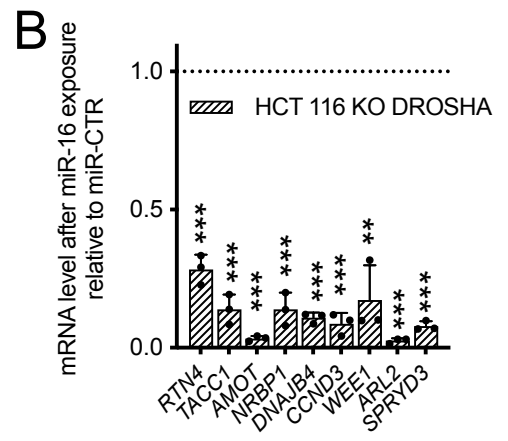
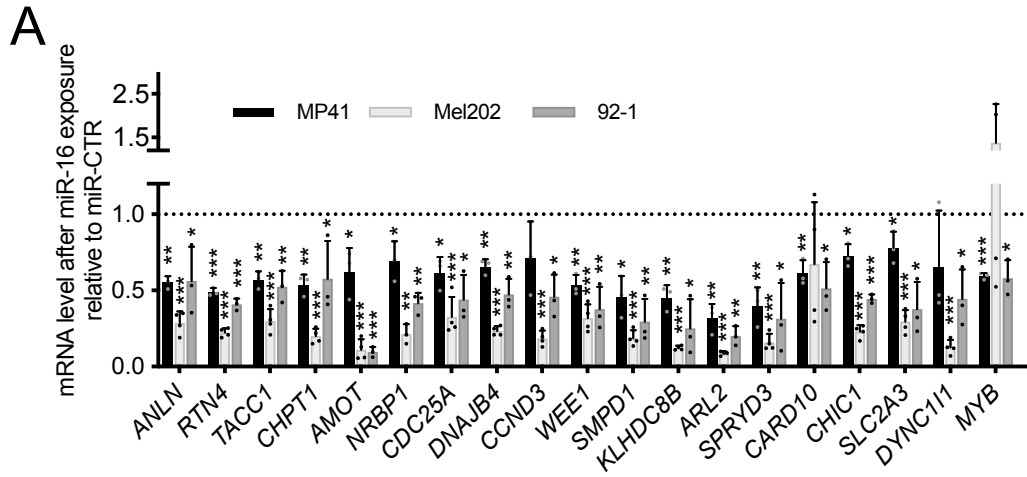
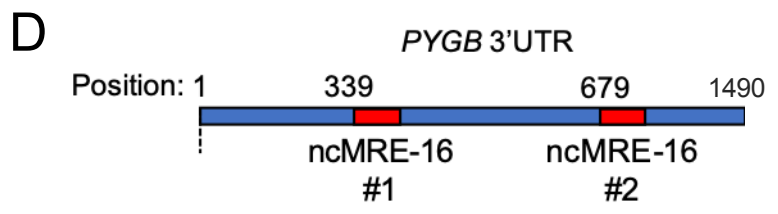
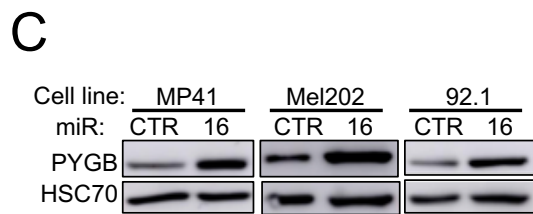
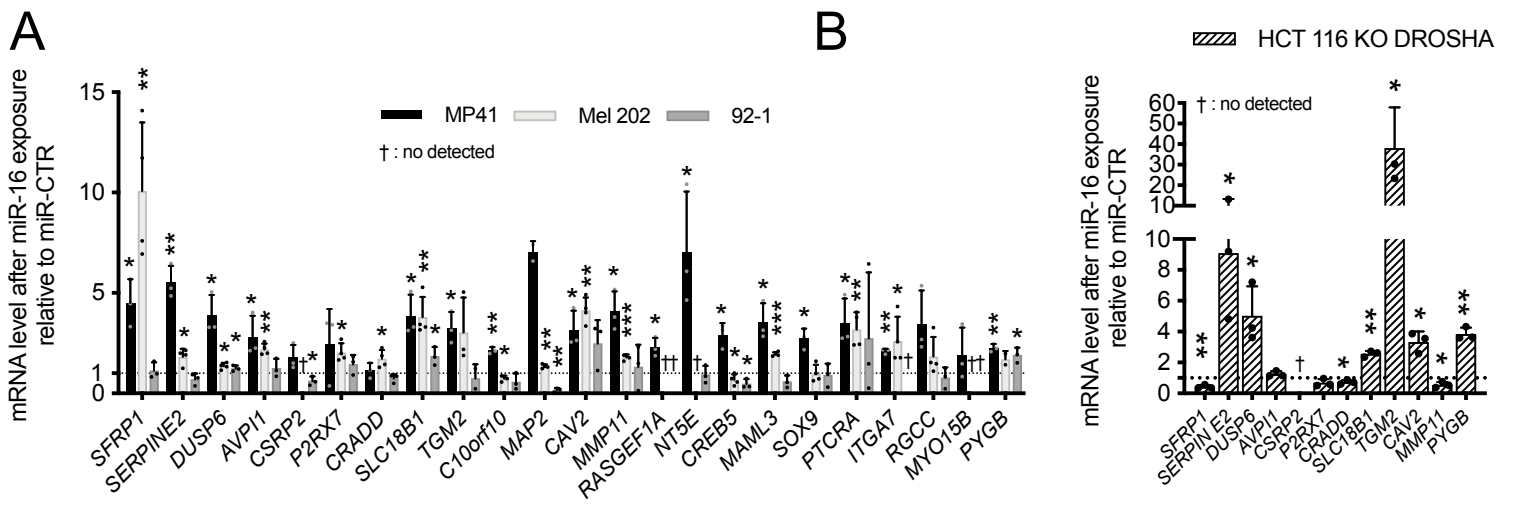


Figure 3: miR-16 targets in uveal melanoma



E

	PYGB motifs		HCT116 KO Drosha cell line		
	#1	#2	Transfection	Transcription	Translation
WT	mfe: -23.3 kcal/mol p-value: 1.000000e+00 position 8 target 5' A CU A 3' GCCGAUGU UUA GUGUUG CGGUUAUA AAU CACGAC miRNA 3' G G GAU 5'	mfe: -21.0 kcal/mol p-value: 1.000000e+00 position 9 target 5' A G CU U U 3' GU GGUG UGUG CUGCUG CG UUAU GCAC GACGAC miRNA 3' G G AAAU 5'	Luciferase gene wt motif + miR-16	mRNA miRNA binding	Luc
MUT	mfe: -9.8 kcal/mol p-value: 1.000000e+00 position 28 target 5' A U 3' GCC CCG miRNA 3' G UUAUAAAUGCACGACGAU 5'	mfe: -9.0 kcal/mol p-value: 1.000000e+00 position 12 target 5' G C 3' GCUA CGAU miRNA 3' GCGGUUAUAAAUGCACGA 5'	Luciferase gene MUT motif + miR-16	mRNA No miRNA binding	Luc

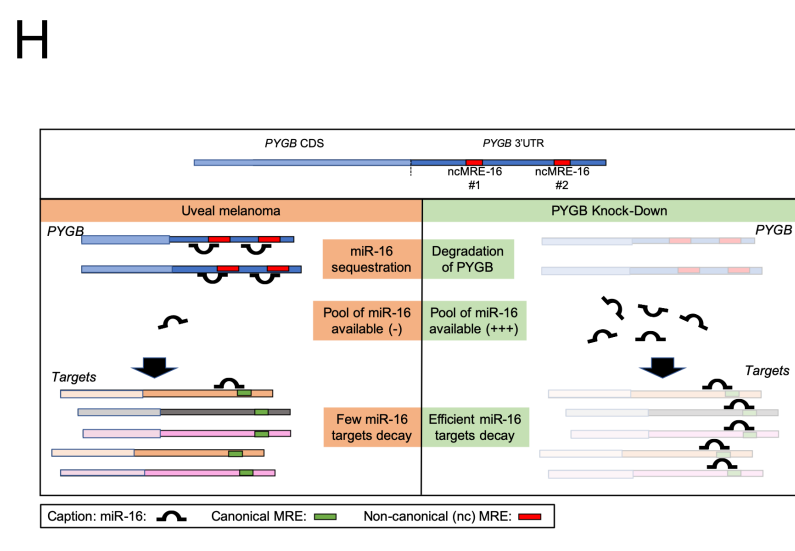
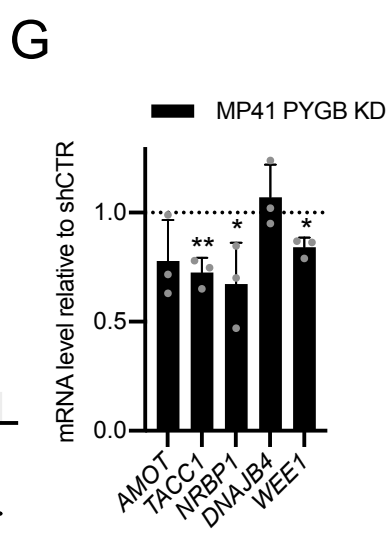
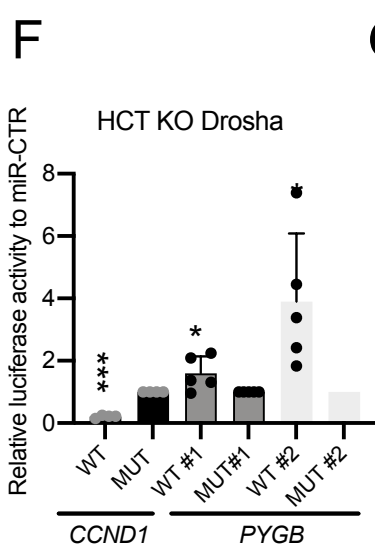


Figure 4: miR-16 activity is impaired by non-canonical miR-16 binding

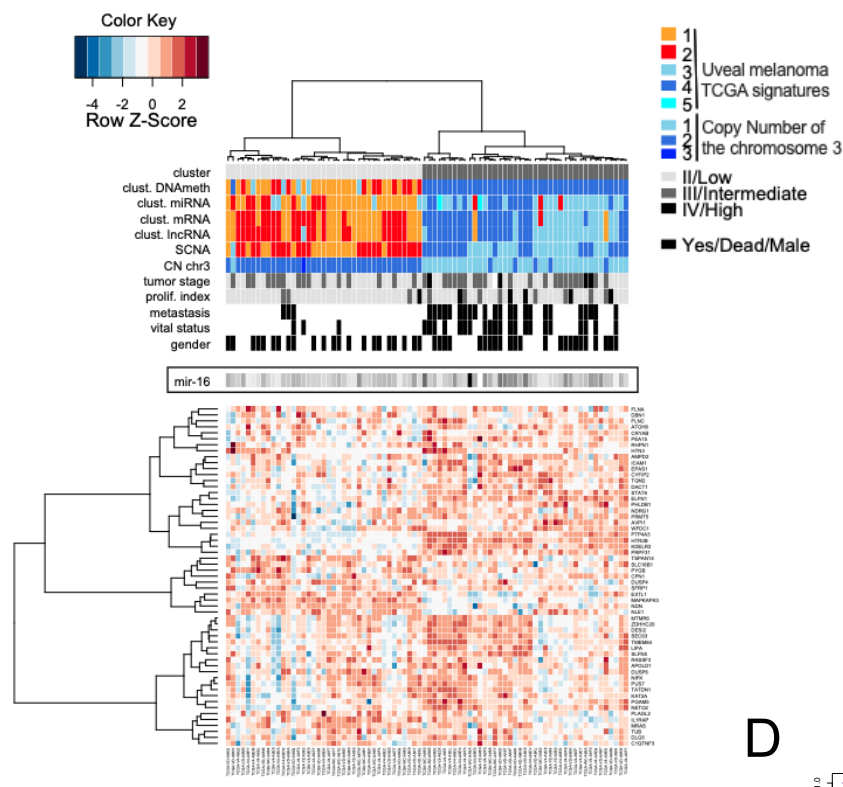
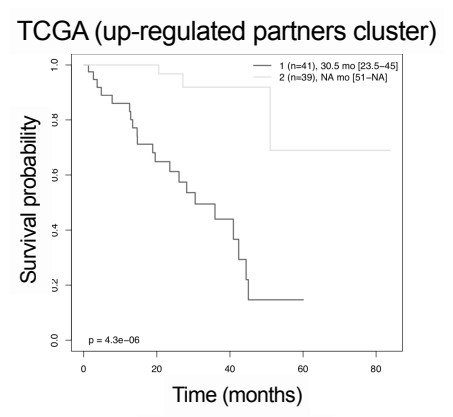
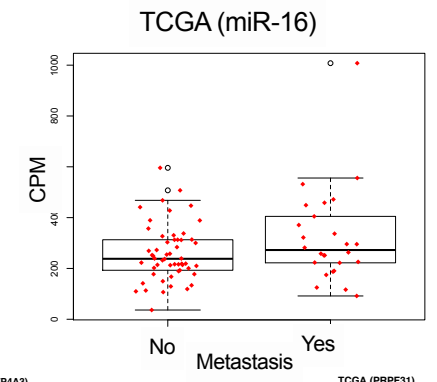
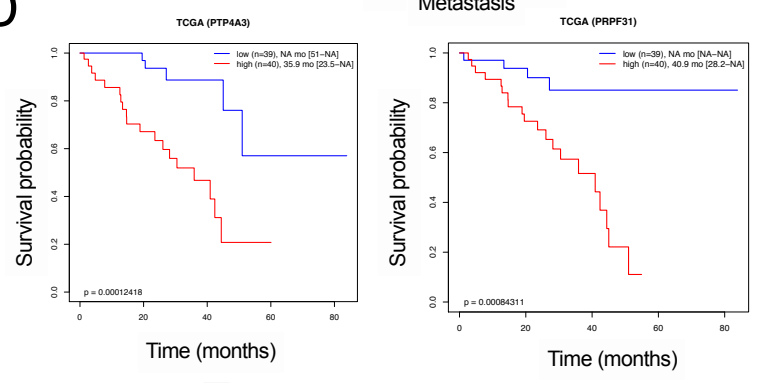
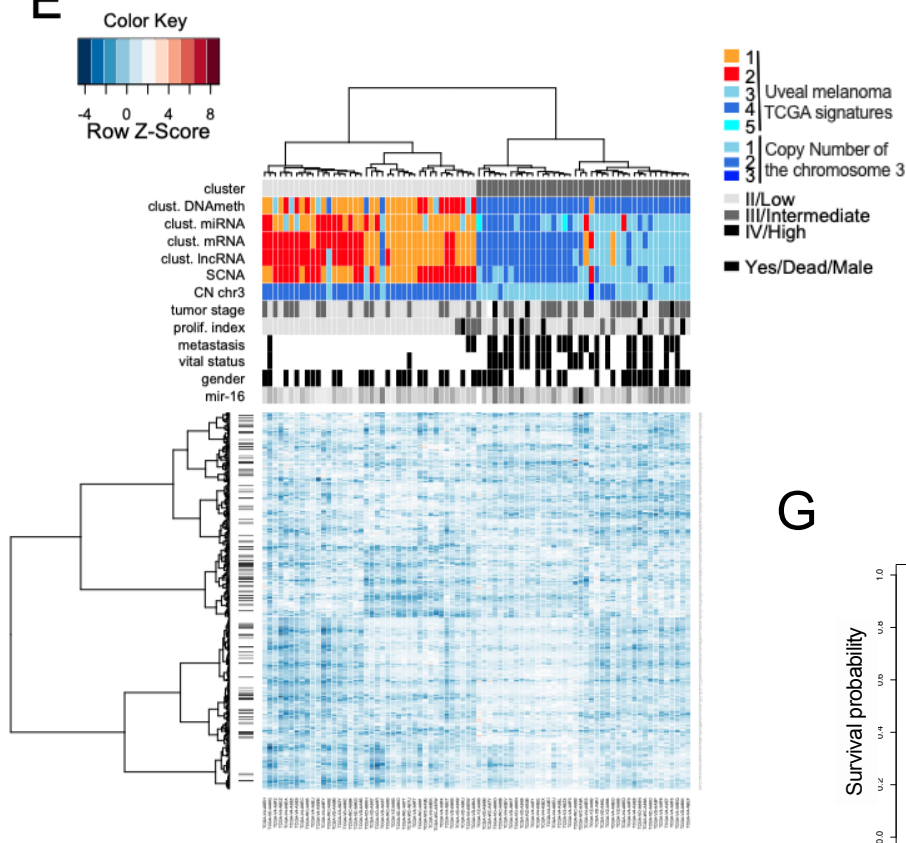
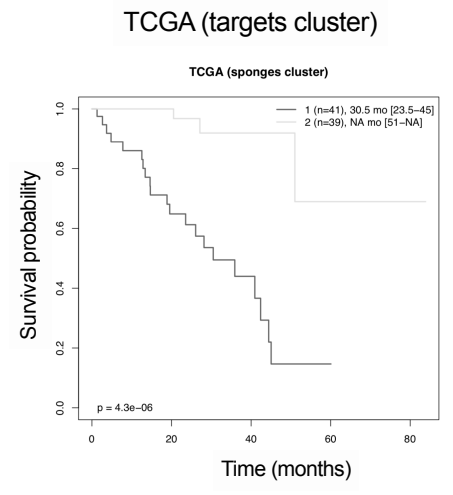
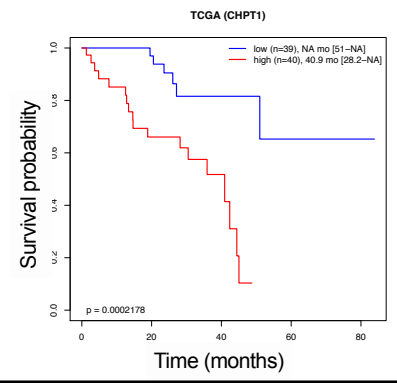
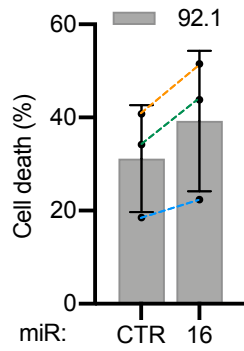
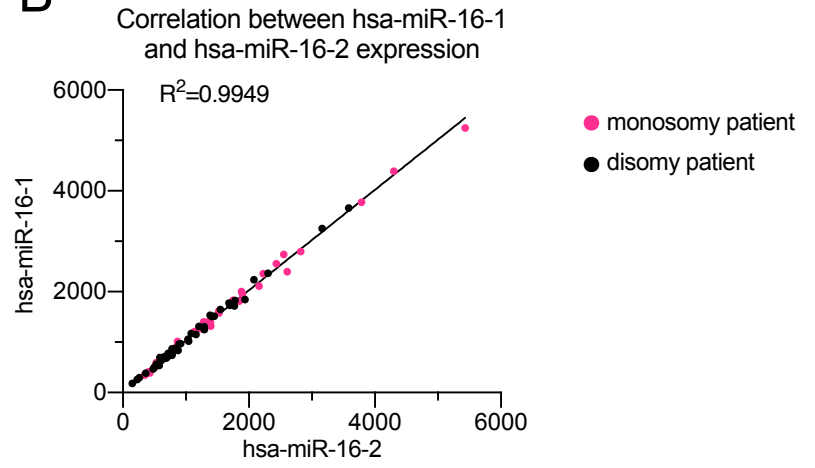
A**B****C****D****E****F****G**

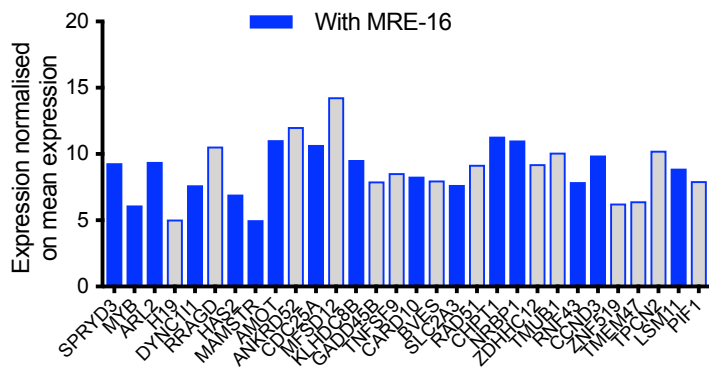
Figure 5: miR-16 availability defines two signatures that predict the prognostic of uveal melanoma patients

A

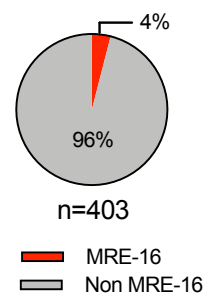
Patient	Chromosome 13
1	t(1:13) + del(13)(q13q21)
2	del(13)(q14q22)
3	del13q
4	Normal
5	Normal

C**B**

A

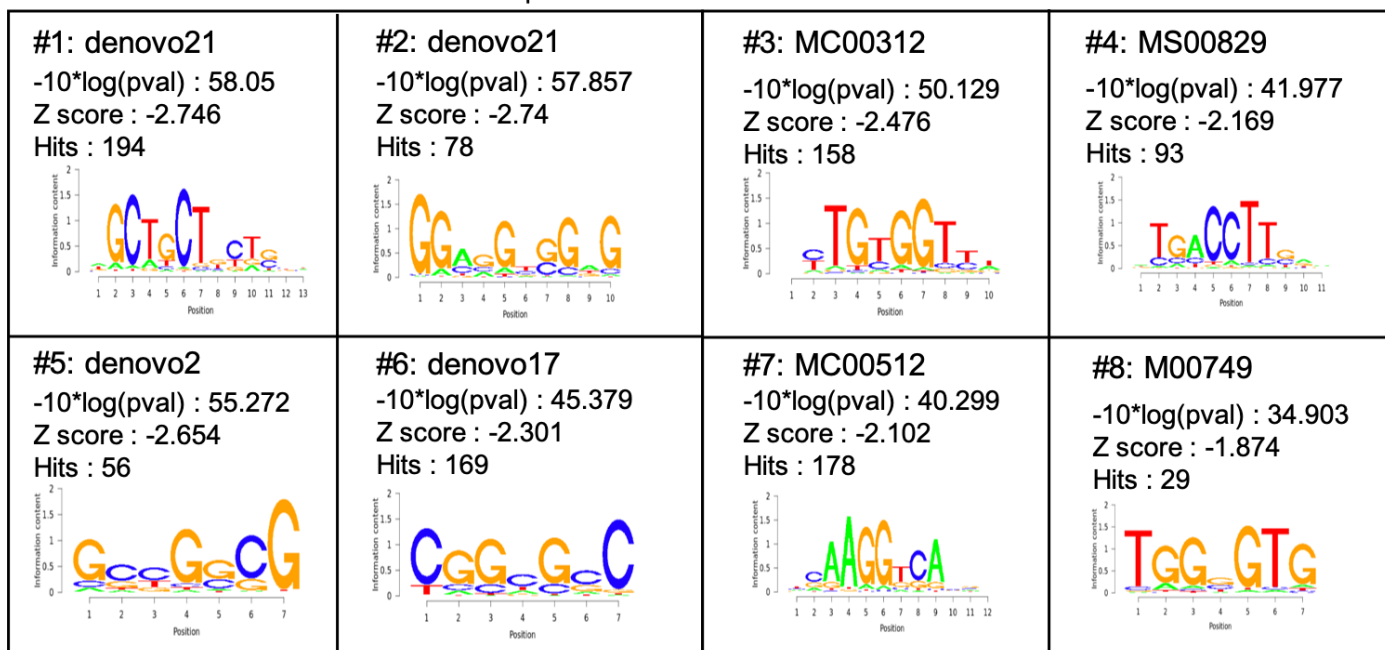


B

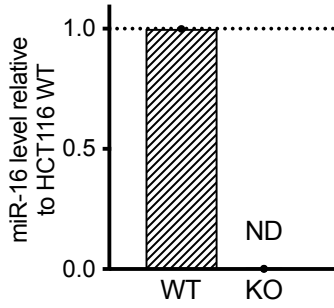


C

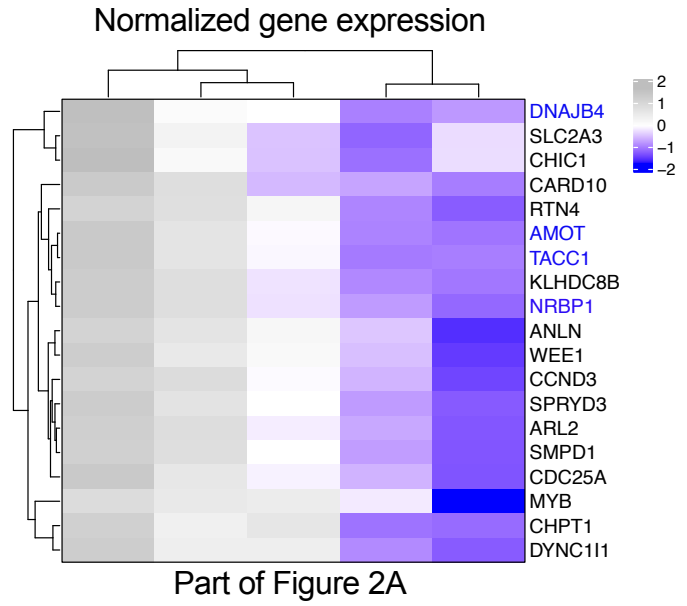
seed region
 hsa-miR-16-5p: 5' UAGCAGCACGUAUUUUGGCG 3'



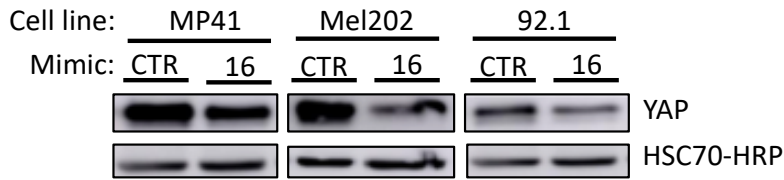
A



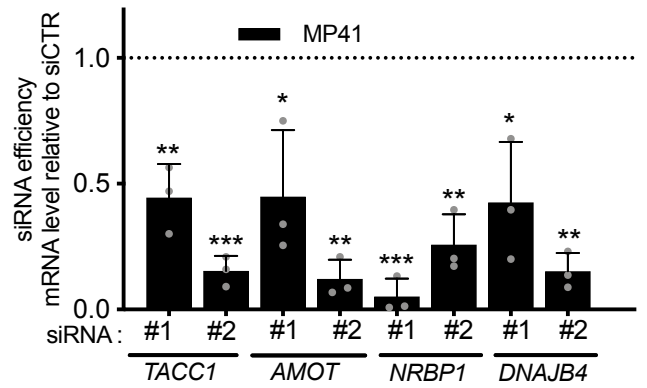
B

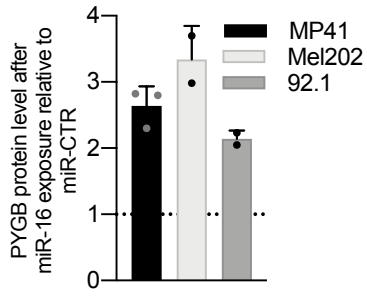
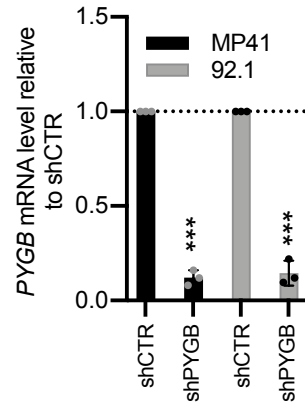


C

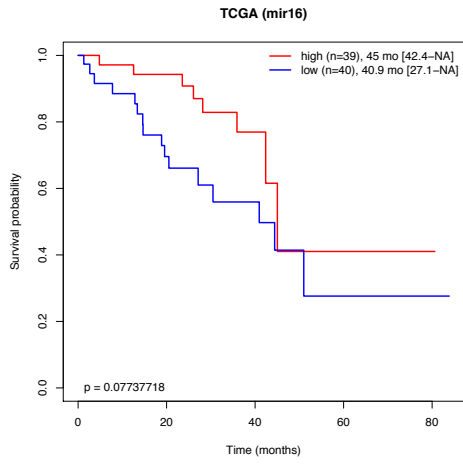


D



A**B**

A



B



Résultats 2 : Revue

Le monde puissant des oligonucléotides anti-sens : de la paille au lit du patient

Revue publiée dans la revue WIREs RNA le 31 mars 2020, et couverture du journal sur le thème de cette revue publiée dans l'édition 5 (Septembre/Octobre 2020)¹

La découverte de l'ARN non codant a permis non seulement un accroissement des connaissances concernant bon nombre de mécanismes moléculaires, mais aussi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

De ces découvertes sont notamment nés les ASO. Ces courtes séquences d'ARN ou d'ADN modifiées chimiquement représentent une classe de molécules thérapeutiques très prometteuse, dont certaines ont déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché. Elles sont utilisées ou à l'étude pour le traitement de plus en plus de pathologies. La particularité des ASO est de cibler principalement l'ARN alors que, les thérapies classiques ciblaient plutôt les protéines, ou encore plus récemment, l'ADN. Le mode d'action des ASO est basé sur la complémentarité de séquence avec la cible. De ce fait, il est possible de concevoir un ASO avec la séquence complémentaire du gène à cibler.

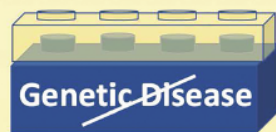
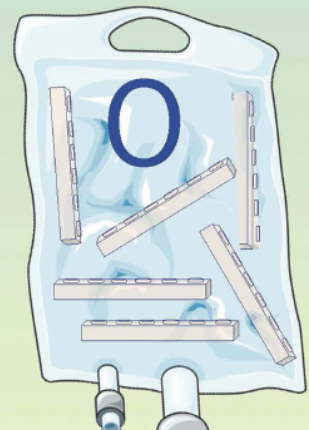
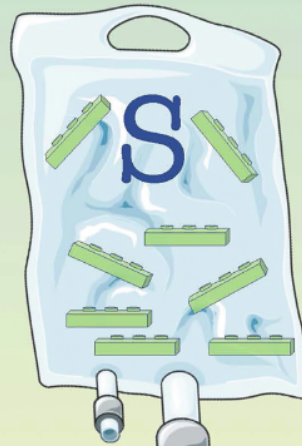
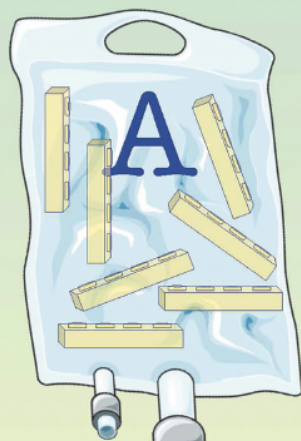
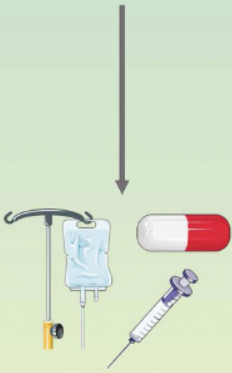
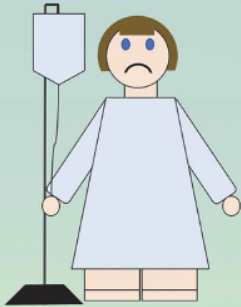
Pour éviter la dégradation par les nucléases cellulaires et limiter la toxicité, plusieurs générations d'ASO caractérisées par des modifications chimiques différentes se sont succédées. Outre le fait qu'elles améliorent la tolérance et la stabilité des ASO, ces modifications chimiques influencent leur mode d'action. En effet, alors que certaines

¹ <https://doi.org/10.1002/wrna.1594>

vont conduire au recrutement de RNAses pour dégrader l'ARN, d'autres vont seulement s'hybrider pour masquer un site sur l'ARN.


Cette revue présente l'évolution et les spécificités de chaque modification chimique utilisée pour la synthèse des ASO. De plus, de nombreuses maladies sont causées par une anomalie ou un dysfonctionnement pouvant être corrigé en ciblant l'ARN. Face à la diversité des pathologies, les ASO sont adaptés pour présenter une activité spécifique à chacune d'entre elles. Cette diversité leur permet ainsi d'être des candidats médicaments pour de très nombreuses maladies comme le cancer ou les maladies rares. Certains d'entre eux ont déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché et pourraient devenir des traitements de référence pour de multiples affections. Dans cette revue, un exemple précis est utilisé pour illustrer chaque mode d'action décrit.

Cette revue met donc en relief les avantages de l'utilisation des ASO, mais aussi les actuelles limitations qu'il faudra dépasser pour augmenter et favoriser leur utilisation thérapeutique.



ADVANCED REVIEW

The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside

Anaïs M. Quemener¹ | Laura Bachelot¹ | Anne Forestier¹ |
Emmanuelle Donnou-Fournet¹ | David Gilot¹ | Marie-Dominique Galibert^{1,2} 

¹Univ Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes)—UMR6290, ARC Foundation Labeled Team, Rennes, France

²Department of Molecular Genetics and Genomic, CHU Rennes, Hospital-University of Rennes, Rennes, France

Correspondence

Marie-Dominique Galibert, University of Rennes, Health Science Villejean Campus, Institute of Genetics and Development of Rennes—CNRS UMR 6290, 2 avenue Pr Léon Bernard, 35043 Rennes Cedex, France.

Email: mgaliber@univ-rennes1.fr

Funding information

ARC cancer care Foundation; Départements du Grand-Ouest; Ligue National Contre le Cancer (LNCC); SATT Ouest Valorization; CNRS, Institut National du Cancer PAIR Melanoma program; University of Rennes

Abstract

Antisense oligonucleotides (ASOs) represent a new and highly promising class of drugs for personalized medicine. In the last decade, major chemical developments and improvements of the backbone structure of ASOs have transformed them into true approved and commercialized drugs. ASOs target both DNA and RNA, including pre-mRNA, mRNA, and ncRNA, based on sequence complementary. They are designed to be specific for each identified molecular and genetic alteration to restore a normal, physiological situation. Thus, the characterization of the underpinning mechanisms and alterations that sustain pathology is critical for accurate ASO-design. ASOs can be used to cure both rare and common diseases, such as orphan genetic alterations and cancer. Through pioneering examples, this review shows the versatility of the mechanisms of action that provide ASOs with the potential capacity to achieve custom treatment, revolutionizing personalized medicine.

This article is categorized under:

RNA in Disease and Development > RNA in Disease

RNA Interactions with Proteins and Other Molecules > Small Molecule–RNA Interactions

KEYWORDS

antisense oligonucleotide, ASO-therapy, cancer, genetic disorders, miRNA sponge

1 | INTRODUCTION

Recent improvements in pharmacology, together with an understanding of the molecular mechanisms underlying diseases, have led to significant advances in the therapeutic management of patients. Personalized and precision medicine is now becoming essential, alongside more general and sometimes only symptomatic treatment. Personalized medicine is adapted to the genetic, molecular, and phenotypic characteristics of the disease and the patient, by targeting specifically causative components. Importantly, one of the major challenges in the current management of many diseases is predicting the responses to treatment as a function of patient-intrinsic characteristics. There is, therefore, a genuine revolution underway in patient care.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *WIREs RNA* published by Wiley Periodicals, Inc.

The understanding of biological mechanisms has made possible the development of the first targeted therapies. They were initially directed against the proteins responsible for, or specifically associated with, a disease. The development of hormonal treatments for so-called “hormone-dependent” breast cancers (ER-positive, estrogen receptor-positive) was driven by the understanding of the role of ER in breast cancer and the identification of mechanisms for its blockade. Tamoxifen is now a standard treatment for ER-positive breast cancers. It acts by competitively inhibiting the binding of estradiol to its receptors (Jordan, 2003). Monoclonal antibodies directed against defined epitopes also constitute a very important class of targeted therapies. They revolutionized the management of inflammatory diseases, such as asthma (Pelaia et al., 2017). However, the identification of the genetic alterations responsible for diseases has provided the major impetus for the use of targeted therapies. For example, the reciprocal translocation t(9; 22), known as the Philadelphia chromosome, is a hallmark of chronic myeloid leukemia (CML). The t(9;22) translocation was, therefore, first used to confirm the diagnosis of CML (Heisterkamp et al., 1990; Rowley, 1973). This translocation generates an aberrant fusion gene (*BCR-ABL*). The resulting BCR-ABL fusion protein has oncogenic properties due to its constitutive tyrosine kinase activity (Lugo, Pendergast, Muller, & Witte, 1990). The development of a competitive inhibitor of ATP binding to the catalytic site of the protein kinase led to a specific therapy: imatinib or Gleevec[®], revolutionizing the management of CML and other diseases (Kantarjian & Talpaz, 2001). Similarly, the identification of oncogenic *NTRK* (Neurotrophic Tropomyosin Related Kinase) fusion genes recently led to the development of specific inhibitors (larotrectinib or Vitakvi[®], entrectinib or Rozlytrek[®]) for the management of NTRK-positive cancers in adults and children (Cocco, Scaltriti, & Drilon, 2018). In oncology, specific inhibitors targeting recurrent point mutations have also been widely developed (Martini, Vecchione, Siena, Tejpar, & Bardelli, 2012; Skoulidis & Heymach, 2019).

In some cases, very little or no protein is produced. This is true for insulin, an enzyme that is deficient in patients with insulin-dependent diabetes (type I). Patients are treated by insulin therapy to faithfully reproduce the effects of the physiological secretion of insulin by administering a substitute protein. The release of the first human insulin protein onto the market in 1982 launched a new paradigm: it became possible to modify the sequence of the hormone protein to match the pharmacokinetic properties to the physiological needs of the patient (McCall & Farhy, 2013).

In addition to these “protein-specific” therapies, approaches targeting DNA (deoxyribonucleic acid) have been developed. As for proteins, the first therapeutic attempts were based on global alterations to DNA, through the use of alkylating agents, for example. These agents induce the creation of non-specific covalent bonds, resulting in the production of DNA-adducts. They disrupt replication and transcription, explaining their use in cancer therapeutics (Noll, Mason, & Miller, 2006). Intercalation is also a special binding mode for small planar molecules to DNA. They alter the conformation of the DNA, disrupting the activities of DNA and RNA polymerases (Binaschi, Zunino, & Capranico, 1995). The use of DNA-targeting molecules is not limited to oncological applications. For example, methotrexate, an antimetabolite that inhibits nucleic-acid synthesis during the S phase of the cell cycle, has replaced the traditionally used silver salts in the treatment of rheumatoid arthritis (Browning, Rice, Lee, & Baker, 1947). In parallel with these molecules that interact with DNA in a non-specific manner, targeted strategies correcting a deleterious gene responsible for a disease have been conceived. This approach is known as gene therapy (Kaufmann, Büning, Galy, Schambach, & Grez, 2013). One very promising example (marketing authorization [MA] pending) concerns the treatment of β -thalassemia, a genetic disorder of hemoglobin. Here, the patient's stem cells are isolated and modified to replace the deleterious gene, such that they can produce normal hemoglobin. The modified cells are then injected back into the patient (Cavazzana-Calvo et al., 2010; Thompson et al., 2018). These spectacular approaches could be considered for many diseases, including diabetes, although they are very complex to put in place.

Finally, mRNA, which was long considered to be a simple intermediate molecule, has recently become a therapeutic target of interest. mRNA is the site of both fine transcriptional and post-transcriptional regulation, being involved in many diseases. As a result, attention has also focused on RNA molecules in recent years, because these molecules, like proteins and DNA, are candidates of interest for the development of targeted therapies (Disney, Dwyer, & Childs-Disney, 2018). The first antisense oligonucleotides (ASOs) emerged in this context. ASOs are single-stranded synthetic RNA or DNA molecules with a mean length of 12 to 25 nucleotides. Their sequences are complementary to that of their target, to ensure specificity. The sequence of the ASO is, therefore, dictated by the sequence of its target. Moreover, these molecules can be localized in both the cytoplasm and nucleus, making it possible to reach cytoplasmic and/or nuclear targets (reviewed in Potaczek, Garn, Unger, & Renz, 2016). ASOs are chemically modified to protect them against the action of nucleases that would otherwise degrade them, and to allow them to pass through the plasma membrane without the need for vectorization. ASOs can be classified into three main generations (described below) on the basis of these changes (Figure 1). The chemistry of the ASO is important because it determines its mode of action (degradation of the target RNA or masking a site without degradation). ASOs can, therefore, be extensively modulated,

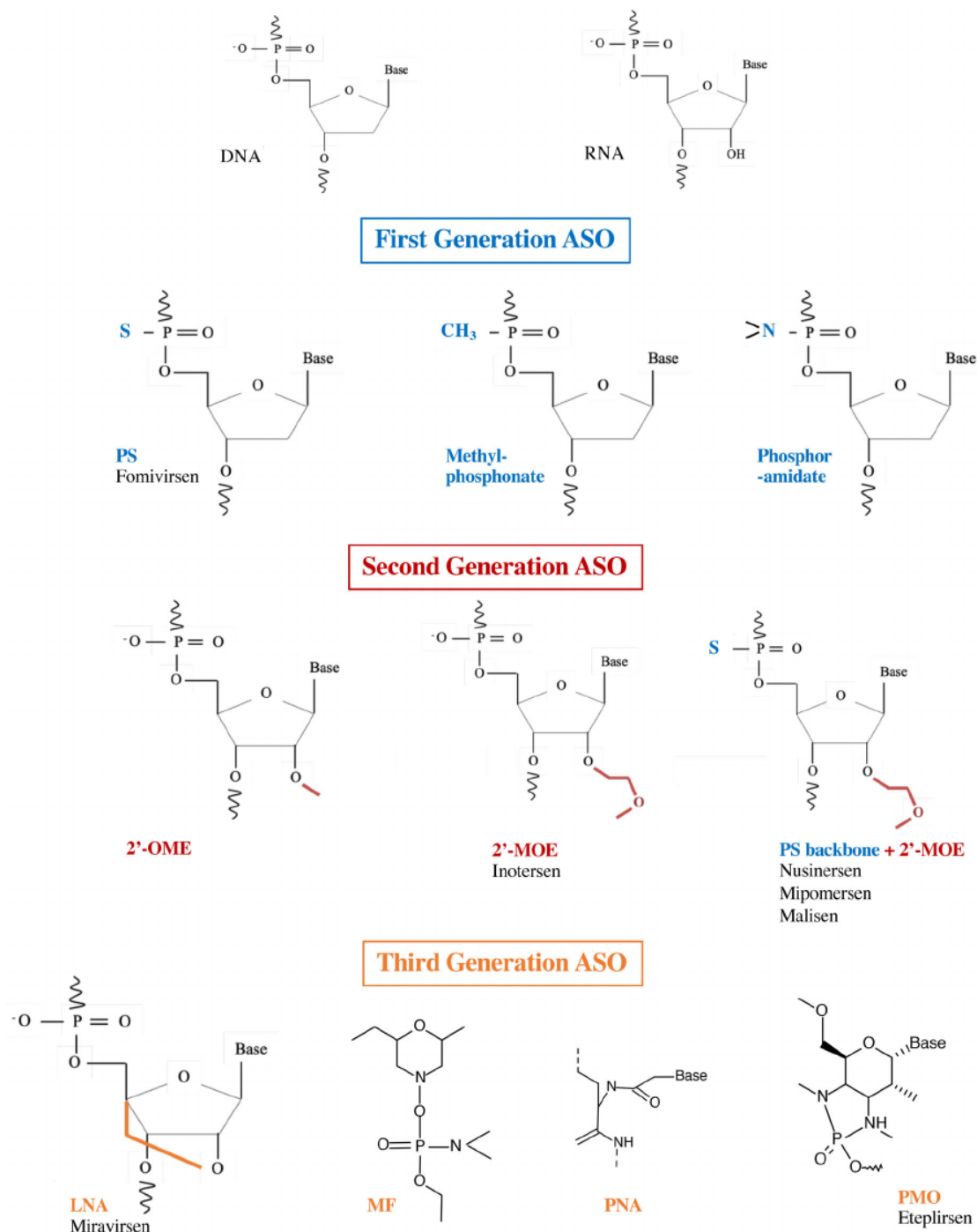


FIGURE 1 Chemical structure of first, second, and third generation ASOs, compared to DNA and RNA structures, followed with examples of FDA-approved drugs. 2'-MOE, 2'-O-methoxyethyl; 2'-OME, 2-O-methyl; ASOs, antisense oligonucleotides; DNA, deoxyribonucleotidic acid; LNA, locked nucleic acid; MF, morpholino phosphorodiamidate; PMO, phosphorodiamidate morpholino oligomer; PNA, peptide nucleic acid; PS, phosphorothioate; RNA, ribonucleotidic acid

making them ideal for use in targeted therapy. Zamecnik and Stephenson first used ASOs for therapeutic purposes in 1978. They used a 13-nucleotide DNA molecule complementary to the Rous sarcoma virus ribosomal RNA to inhibit its translation, thereby preventing the oncogenic transformation of chicken fibroblasts infected with Rous virus in vitro (Figure 2) (Stephenson & Zamecnik, 1978).

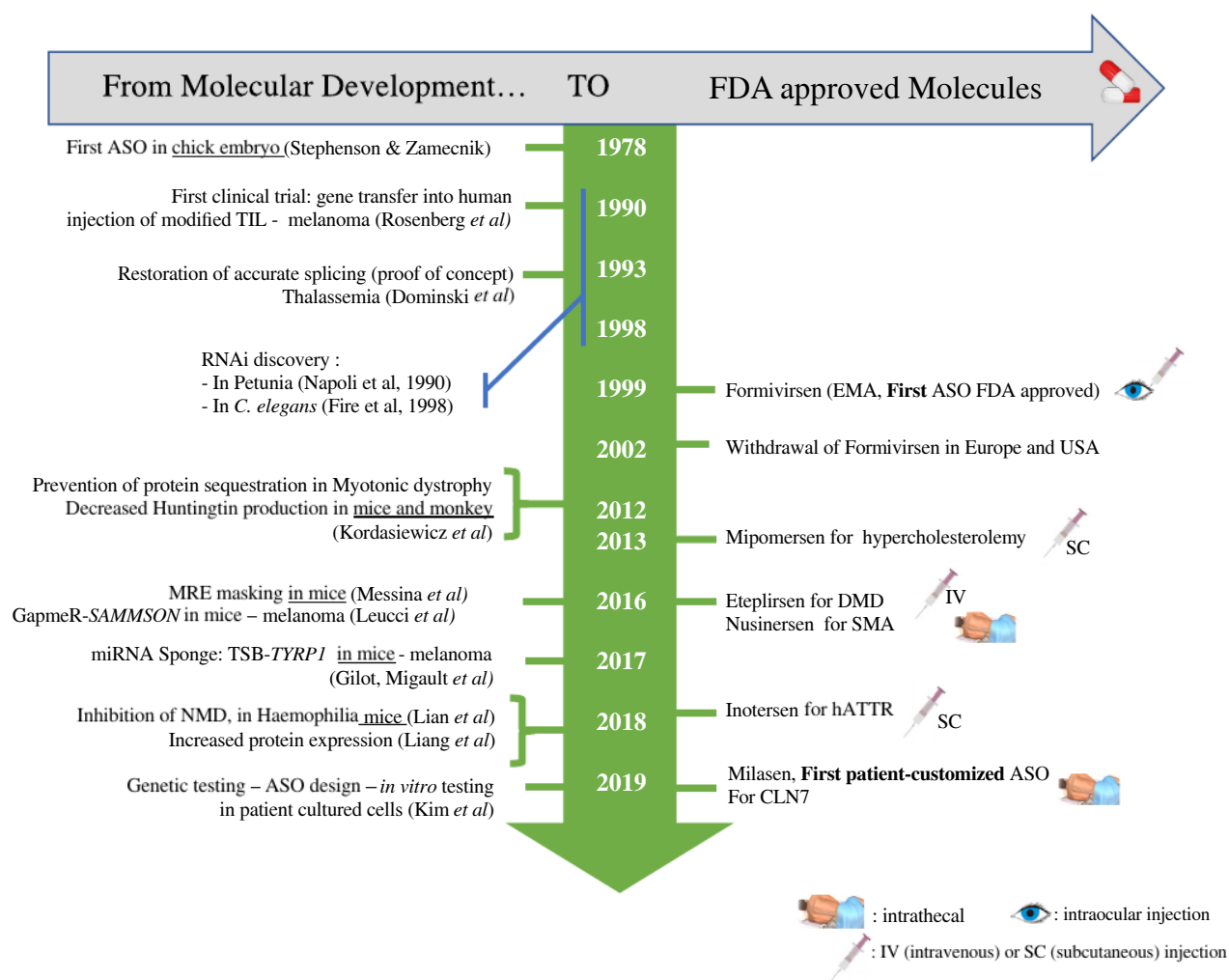


FIGURE 2 Timeline of ASO drug development and approval. ASO, antisense oligonucleotide; hATTR, polyneuropathy of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis; SMA, spinal muscular amyotrophy

Several molecules have now received marketing authorization from drug agencies (Food and Drug Administration (FDA) in the United States of America and European Medicines Agency (EMA) in Europe). This is the result of many years of basic research and clinical trials. Throughout pioneering examples, this review aims to underscore the versatility of ASOs for the treatment of various diseases through the targeted and personalized RNA-based approach they allow.

1.1 | What type of chemistry for ASOs?

ASOs are short (about 12 to 25 nucleotides long) single-stranded nucleic acid (DNA or RNA) sequences. In their naked form, they cannot permeate the plasma membrane and are highly sensitive to degradation by endonucleases and exonucleases. ASOs have been chemically modified to overcome these problems. On the basis of these modifications, ASOs can be broadly classified into three generations (Mansoor & Melendez, 2008).

In first-generation ASOs, the phosphate backbone linking the nucleotides is modified. One of the non-bridging oxygen atoms in the phosphodiester bond is replaced by a sulfur, methyl or amine group, generating phosphorothioates (PS), methyl-phosphonates, and phosphoramidates, respectively (Figure 1). These modifications are not equivalent, and each has its own specific features. PS oligonucleotides are highly representative of this first generation, being the most widely used. These chemical modifications improve stability by increasing the resistance of

ASOs to nucleases, a constant goal being to expand the ASO half-life. PS modifications transform the half-life from minutes to days. Importantly, these modifications activate RNase H (Campbell, Bacon, & Wickstrom, 1990; Kurreck, 2003; Stein, Subasinghe, Shinozuka, & Cohen, 1988). RNase H is a ubiquitously expressed enzyme that cleaves the RNA strand in a DNA–RNA duplex (Furdon, Dominski, & Kole, 1989; Miller, Riggs, & Gill, 1973). RNase H can, therefore, degrade the target mRNA within the ASO/mRNA complexes, limiting the synthesis of the encoded protein. Unfortunately, the biologically active modified ASOs (PS) are highly toxic due, in particular, to their non-specific binding to proteins (Koziolkiewicz et al., 2001). This led researchers to develop new generations of ASOs that were both less toxic and more specific.

The second generation of ASOs is characterized by alkyl modifications at the 2' position of the ribose. The introduction of an oxygenated group leads to the formation of 2'-*O*-methyl (2'-OME) and 2'-*O*-methoxyethyl (2'-MOE) nucleotides (Figure 1) (Monia et al., 1993; Nicolussi, D'Inzeo, Capalbo, Giannini, & Coppa, 2017). These ASOs are less toxic than PS and have a slightly higher affinity for their target. However, these modifications are incompatible with the recruitment of and cleavage by RNase H. The antisense effect of this type of ASO is probably due to steric blockade of translation. Such modifications are of potential interest if the target RNA must not be degraded.

The third generation is more heterogeneous because it includes a large number of modifications aiming to improve binding-affinity, resistance to nucleases, and pharmacokinetic profile (Figure 1) (Khvorova & Watts, 2017). The most common modifications include locked nucleic acids (LNAs), corresponding to a methylene bridge connecting the 2'-oxygen and 4'-carbon of the ribose (Hagedorn et al., 2018); phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs), in which the ribose is replaced by a morpholine moiety and the phosphodiester bond by a phosphorodiamidate bond; and peptide nucleic acids (PNAs), in which the ribose-phosphate backbone is replaced by a polyamide backbone consisting of repeats of *N*-(2-aminothyl) glycine units, to which the bases are linked (Egholm et al., 1993; Nielsen, Egholm, Berg, & Buchardt, 1991). These last two structures are uncharged and bind to plasma proteins with a lower affinity than charged ASOs, which increases their distribution and elimination in urine (Shen et al., 2019). The fraction eliminated has been shown to correspond to approximately 10–30% of the amount administered, contributing to tissue accumulation (Amantana & Iversen, 2005). These modifications confer high stability but do not elicit RNase H recruitment. This third generation of ASO forms a stable hybrid with its target mRNA, thereby interfering with its processing or translation.

The conformational constraint of the LNA modification imposed by the connecting bridge and that of its methylated analog (known as “constrained ethyl”: cET) have created new opportunities in chemical therapeutics. Tricyclo-DNA (tcDNA) belongs to this class of conformationally constrained DNA analogs with enhanced binding properties. They do not elicit RNase-H activity but show increased stability and improved cellular uptake, giving them substantial therapeutic advantages over those of ASOs (Goyenvalle et al., 2015; Renneberg, Bouliong, Reber, Schümperli, & Leumann, 2002; Steffens & Leumann, 1997).

As underscored previously, ASOs carrying most second- and third-generation chemical modifications do not elicit RNase H activity. RNase H activity can however be restored by inserting a stretch of unmodified or PS-DNA cleavage-sensitive sequence between a pair of non-RNase H-sensitive sequences at the ends of the ASO. The resulting structure is known as a “gapmer.” The “gapmer” approach was first shown by Inoue for a 2'OME PO ASO (Inoue et al., 1987), followed by a 2'MOE gapmer in 1993 (Monia et al., 1993). Nearly a decade later, the gapmer structure was used with a third generation ASO (Kurreck, 2003; Shen, Kandimalla, & Agrawal, 1998; Veedu & Wengel, 2009).

Overall, such diversity of chemical modifications, together with the structure of the ASO, offers considerable flexibility for the adaptation of the therapeutic approach according to the chosen target and mechanism of action.

1.2 | One or several mechanisms of action?

The working principle of ASO depends on its intrinsic parameters (RNA or DNA sequence and chemistry) and the target sequence. The choice of ASO is, therefore, guided by the required molecular effect (reviewed in Kurreck, 2003; Potaczek et al., 2016).

1.2.1 | Degradation of the mRNA to decrease protein levels

Levels of mRNA are tightly regulated by the binding of small non-coding RNAs, microRNAs (miRNAs), by sequence complementarity. This process was first described in plants (Napoli, Lemieux, & Jorgensen, 1990) and then in the nematode

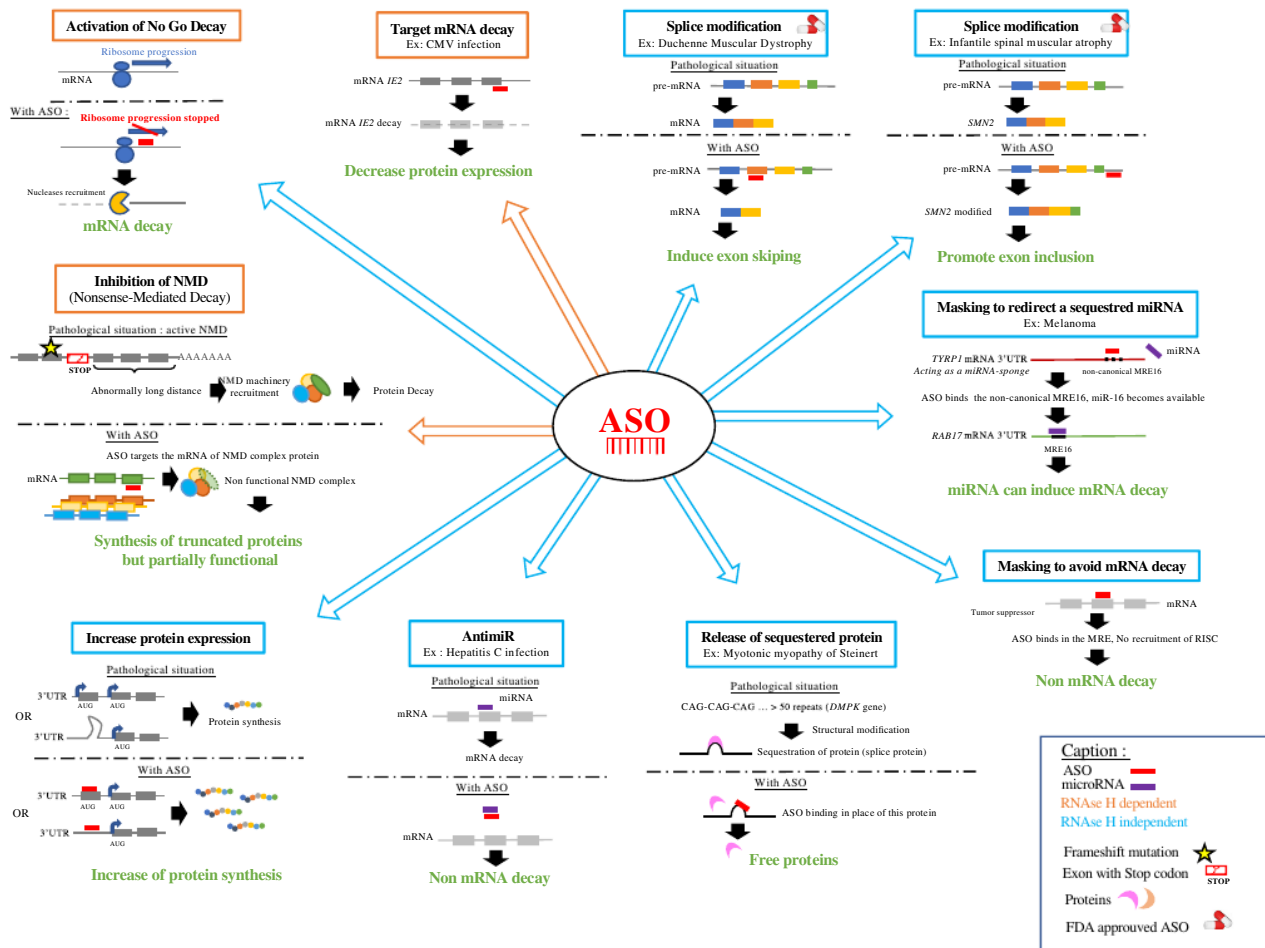


FIGURE 3 Schematic representation of multiple therapeutic options using ASOs. ASOs, antisense oligonucleotides

Caenorhabditis elegans (Fire et al., 1998). These discoveries opened up a new field, that of RNA interference (Mello & Conte, 2004). In addition to improving our fundamental knowledge, these discoveries have increased our understanding of certain diseases and made it possible to develop new therapeutic strategies. The regulation exerted by endogenous miRNAs can be mimicked by exogenous molecules, such as ASOs. The binding of these molecules to a target can illicit its degradation.

This strategy led to the development of the first ASO (fomivirsen) approved by the FDA in 1998 and the EMA in 1999 (Figure 2). Fomivirsen was marketed by Ionis Pharmaceuticals (formerly Isis) and Novartis Ophthalmics under the name Vitravene[®] (or Isis 2,922). Fomivirsen is a phosphorothioate oligodeoxynucleotide, the only first-generation ASO to have received marketing authorization. It was used to treat cytomegalovirus (CMV) retinitis. This ASO specifically targets the viral mRNA encoding the immediate early-2 (IE-2) protein. IE-2 is required for viral replication (Figure 3). In healthy individuals, CMV infection often goes unnoticed. By contrast, infection may be severe in immunodeficient individuals. This treatment was, therefore, recommended for patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), in whom CMV infection can lead to the progressive destruction of retinal cells (Geary, Henry, & Grillone, 2002; Roehr, 1998; Vitravene Study Group, 2002). Given the localized nature of the cells to be treated, local administration was approved. Fomivirsen was injected intraocularly (in the vitreous humor) at a dose of 165 µg per week for 3 weeks, in newly diagnosed patients. The dose was doubled for patients diagnosed at an advanced stage. This targeted therapy was effective, but caused severe localized adverse effects (increased intraocular pressure and local inflammation) (Perry & Barman Balfour, 1999). Fomivirsen was withdrawn from the market in 2002 in Europe and 2006 in the US (EMA: EMEA/12382/02; FDA document number: 2011-14164) (Figure 2). Fortunately, the tri-therapy now used to treat AIDS has substantially decreased the prevalence of CMV infection. The withdrawal of fomivirsen has not hindered the development of new ASOs but has rather fostered the development of less toxic molecules.

1.2.2 | ASOs for modifying or correcting splicing events

Maturation of pre-mRNA into mRNA is a normal process in which intron sequences are excluded and exons are selected to form the mature mRNA. This process is tightly regulated, making it possible to generate several protein isoforms from the same pre-mRNA, depending on the cellular context. Isoforms may have very similar functions or they may be very different. They can be ubiquitous or have a cell/organ-specific location. Splicing is not, therefore, random and involves a large number of proteins forming a splicing complex, which specifically recognizes the splice donor and acceptor sites (Matera & Wang, 2014). Splicing defects can cause severe illness. In 1993, Dominski and Kole demonstrated that ASOs, here called splice switchers, could restore splice defects in patients with β -thalassaemia. They showed that 2'-O-methylribooligonucleotides targeting specific sequence elements in mutated human β -globin pre-mRNA could eliminate the aberrant splicing pattern of the β -globin pre-mRNA (Figure 2) (Dominski & Kole, 1993). These results served as a proof-of-concept and opened up new therapeutic perspectives, with the ability to modulate or block the splicing machinery. This strategy has been successful in the treatment of spinal muscular atrophy (SMA). SMA is an autosomal recessive neuromuscular disease caused by the progressive loss of motor neurons, leading to muscle atrophy and infant death. SMA is due to deleterious mutations of the *SMN1* (survival of motor neuron 1) gene. These genetic alterations lead to the absence of SMN protein production. Interestingly, SMN proteins are encoded by two paralogous genes: *SMN1* and *SMN2*. The *SMN1* and *SMN2* genes are identical (99% homology), except for an 11-nucleotide sequence in exon 7. This difference alters splicing. The splicing of the *SMN2* pre-mRNA leads to the exclusion of exon 7, generating a truncated, unstable protein that is rapidly degraded. *SMN2* cannot, therefore, compensate for the loss of *SMN1* expression in SMA. Nusinersen, discovered by Ionis Pharmaceuticals and co-developed by Biogen (Spinraza[®]), was designed to correct *SMN2* splicing, thus allowing *SMN2* to compensate for the loss of expression caused by the *SMN1* mutation. This 2'-O-methoxyethyl (2'-OME) phosphorothioate (PS) 18-mer is a second-generation ASO, which cannot recruit RNase H. It targets the intronic splicing silencer (ISS-N1), promoting the inclusion of exon 7, thereby restoring the production of a stable SMN2 protein (Figure 2) (Hua et al., 2010; Hua et al., 2011; Mercuri et al., 2018). Clinical trials proved its efficacy, leading to FDA and EMA approval in 2016. Nusinersen is administered intrathecally on weeks 0, 2, 4, and 8, followed by an injection once every 4 months for maintenance (Figures 2 & 3) (Biogen, 2019; Finkel et al., 2017; Mercuri et al., 2018).

1.2.3 | Masking of miRNA response element (MRE) sites

ASOs can be used to mask miRNA-binding sites of mRNAs to modulate their expression. MicroRNAs are small (mean length: 22 nucleotides) non-coding RNAs that specifically hybridize to mRNAs to fine-tune their expression. miRNAs bind to their cognate target RNA through RNA–RNA base-pairing. The miRNA binding sequence is referred to as a miRNA recognition element (MRE). MREs are complementary to miRNA seed regions (Bartel, 2009). Perfect base-pairing leads to the recruitment of a protein complex, resulting in degradation of the target mRNA (Song, Smith, Hannon, & Joshua-Tor, 2004).

The overexpression of miRNA in certain diseases, including cancers, can lead to massive pathological degradation of their targets. ASOs binding to specific MREs could thus be used to block such mRNA degradation. In this case, ASOs are specific for mRNA and not miRNA. No therapeutic molecules based on this mode of action are currently available. However, the group of Prevot has demonstrated the efficacy of such an approach (Messina et al., 2016). Their studies focus on the role of miRNAs in the production of pituitary gonadotropins (GnRH) during development, especially before puberty. In this context, third-generation ASOs, mixmers composed of modified nucleotides (LNAs), marketed as target-site blockers (TSB), have been used to validate the targets of certain miRNAs. In general, TSBs bind to RNA without inducing RNase H activity. Their sequences are 100% complementary to those of the RNA sequence containing the MRE motif, resulting in specific binding to the RNA target. As TSBs have a higher (100% complementary) affinity than miRNAs for the same MRE sequence, competitive binding favors the ASO (Figure 3). In vivo, TSBs increase the expression of their specific targets, without affecting other targets of the same miRNA. Interestingly, the TSBs were injected directly into mouse brains (Messina et al., 2016).

1.2.4 | Release of a sequestered protein

The role of mRNAs is not necessarily restricted to coding; some have structural functions. These functions may be physiological or pathological and can, therefore, be targeted by treatments.

Steinert's disease, also known as type 1 myotonic dystrophy (DM1), is a clinically heterogeneous neuromuscular disease. DM1 is a triplet-repeat disease originating from progressive expansion of CTG repeats in the 3' UTR of the *DMPK* (DM1 protein kinase) gene (Orengo et al., 2008). The disease displays autosomal dominant transmission, and disease severity varies with the number of CTG repeats (Brook et al., 1992). The excess of triplet-repeats results in the formation of secondary stem-loop structures on the mRNA, which does not exit the nucleus. These toxic mRNA molecules accumulate in the nucleus and their secondary structures associate with proteins, such as MBNL1 (muscleblind-like splicing regulator 1). As MBNL1 protein is involved in the regulation of splicing, its sequestration in nuclear foci leads to multiple splicing abnormalities and spliceopathies. ASOs are being studied as possible replacements for the chemical inhibitors used to treat this disease (Haghighat Jahromi, Honda, Zimmerman, & Spies, 2013). Several strategies are possible.

The first involves degrading the toxic mRNA to release the sequestered protein. By degrading the *DMPK* mRNA with an ASO displaying RNase H activity (MOE gapmers), the sequestered MBNL1 protein is released and accurate splicing is restored (Langlois, Lee, Rossi, & Puymirat, 2003; Mulders et al., 2009). This strategy is illustrated in Figure 3 (Wheeler et al., 2012).

The second strategy is based on competitive binding between ASOs and the sequestered protein. Here, a CAG-repeat morpholino oligomer (without activating RNase H) competes with MBNL binding to the CUG-repeats. This ASO has been shown to be effective in triggering the release of MBNL and restoring splicing function in mice (Wheeler et al., 2012).

1.2.5 | Modulation of RNA translation quality-control mechanisms

Multiple quality control mechanisms recognize and eliminate defective mRNA molecules during the process of translation to ensure RNA and protein quality.

Nonsense-mediated decay (NMD) is one of such quality-control mechanisms for mRNAs. It eliminates mRNAs that include a premature stop codon. This allows the removal of abnormal proteins that are non-functional or with impaired function, and prevents the production of proteins with dominant-negative activity (Frischmeyer & Dietz, 1999). However, in certain situations, the maintenance of partially-functional truncated proteins may be of clinical interest. In these particular situations, therapeutic approaches targeting NMD may be attractive. NMD inhibition must be tightly controlled and adapted, to prevent dramatic consequences. The implementation of such approaches requires a thorough knowledge of the various components of the NMD complex to specifically disrupt only one of them. Huang et al. recently identified several candidate factors, including the Upf3b regulator of NMD, for the development of a specific ASO (L. Huang et al., 2018). Consistent with previous results, they showed that Upf3b is not essential for development and that it regulates only a subset of endogenous NMD substrates. Upf3b depletion is well tolerated, with minimal impact on normal transcriptome. Upf3b-ASO treatment resulted in significant stabilization of the *dystrophin* mRNA in MDX mice, a model of Duchenne myopathy that harbors a nonsense mutation (CAA to TAA) in exon 23 of the *dystrophin* gene, resulting in a premature translation termination codon. They obtained comparable results in a hemophilia mouse model, in which Upf3b-ASO treatment restored the production of functional factor IX protein (Figure 3) (Huang et al., 2018; Zhang et al., 2019).

This approach has been studied only in mice, but shows much promise. This strategy is less precise than other modes of action, because it acts on a ubiquitous regulatory pathway. This shows that ASOs can also be used for more global strategies.

Another mechanism involved in translational control is no-go decay (NGD). NGD is triggered by obstacles that impede ribosome movement along the mRNA. These altered mRNA molecules are targeted for degradation, initiated by endonucleolytic cleavage in the vicinity of the stalled ribosome (Harigaya & Parker, 2010). Comparable to natural obstacles, ASOs that do not initiate RNase H cleavage can be used to bind to the coding sequence and disturb ribosome scanning, leading to stalling of the ribosome. In this specific context, ASOs can promote the NGD pathway, leading to a decrease of the target mRNA. This mechanism has been demonstrated by Liang et al. in several human and mouse cell lines (Figure 3) (Liang, Nichols, Hsu, Vickers, & Crooke, 2019). This original ASO-driven approach constitutes a promising alternative option to induce mRNA decay.

1.2.6 | Increasing protein levels

Certain diseases are characterized by a deficit in the synthesis of a given protein; specifically increasing its production is, therefore, of potential therapeutic interest. Although still very challenging, efforts are being made to increase the production of selected proteins using ASOs. The group of Crooke has used modified ASOs that bind to mRNA sequences in the upstream open reading frame (uORF) to specifically increase the synthesis of the main protein translated from a downstream primary ORF (pORF). They generated ASOs (2-O-methyl modifications and phosphodiester [PO] links) that specifically hybridize to the start codon (uAUG) of such uORFs. By specifically blocking translation of the uORF, the ASO redirects the translation machinery to the pORF. The efficacy and specificity of this approach has been evaluated with several human and mouse model genes (including the human *RNAseH1* and sideroflexin 3 [*SFXN3*] genes). This resulted in a significant increase in the level of the corresponding proteins (Liang et al., 2016).

They also showed that ASOs can specifically bind to the secondary structures of 5' UTRs, shown to be negative regulators of translation. Various ASOs designed to bind to these loop-stem structures can increase translation. The human *RNAseH1*, *LDLR*, and *ACPI* and mouse *ARF1* and *ACPI* genes have been targeted, resulting in significant increases in the levels of the corresponding proteins (Liang et al., 2017). These two approaches are complementary, as not all mRNAs have an upstream start codon or secondary structures (Figure 3).

In parallel to these strategies that directly target regulatory sequences, it is possible to increase the level of a protein through indirect routes. Such a strategy has been used to increase the levels of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) by targeting its regulator PCSK9 (Gupta et al., 2010). The proprotein PCSK9 (protein convertase subtilisin/kexin type 9) is a key etiological factor in familial hypercholesterolemia. PCSK9 accelerates LDLR degradation (Cohen, Boerwinkle, Mosley, & Hobbs, 2006). Low levels of hepatic PCSK9 are, therefore, associated with higher LDLR levels, faster clearance of LDL-cholesterol, and lower levels of LDL-cholesterol in the bloodstream. The use of ASO-LNA specifically targeting the *PCSK9* transcript leads to a sharp decrease of PCSK9 levels in vitro (liver cells) and in vivo (mouse liver) (Gupta et al., 2010). Although not an ASO, Inclisiran, a siRNA targeting *PCSK9* mRNA, is currently being tested in preclinical trials (ORION-1, ClinicalTrials.gov number: NCT03705234) (Ray et al., 2017). It acts by a different mechanism. Once the double-stranded siRNA enters the cell, the complementary strand of the target or guide strand is loaded onto the RISC complex (RNA-induced silencing complex). The target RNA is specifically recognized by complementary hybridization with the siRNA and cleaved by one of the proteins of the RISC complex (Figure 3). Inclisiran has been chemically modified to increase its stability and duration of action (Fitzgerald et al., 2017).

1.2.7 | Targeting pathological miRNAs: Anti-miRs

MicroRNAs tightly regulate gene expression, thereby controlling many physiological functions. Because they are important regulators, they are also associated with disease. Inhibition of their activity may, therefore, be an effective therapeutic strategy (Krützfeldt et al., 2005). Anti-miRs are ASOs with sequence complementary to the endogenous miRNA targeted, forming stable, high-affinity bonds. Like ASOs, they can be synthesized with various chemical characteristics (Stenvang, Petri, Lindow, Obad, & Kauppinen, 2012).

Miravirsin (Roche/Santaris) is one of the first miRNA therapies to be developed and undergo clinical testing. It targets miR-122 for the treatment of hepatitis C virus infections. miR-122 is a key player in liver development. This abundant miRNA is produced in a specific manner. It also plays an important role in the replication cycle of the hepatitis C virus (HCV), helping to stabilize the viral genome. Patients infected with HCV have a long-term risk of developing liver cancer (Lee, Yang, Yuan, L'Italien, & Chen, 2014). The sequestration of miR-122 with an anti-miR is, therefore, of therapeutic interest. Miravirsin is a third-generation ASO (ASO-LNA). Its sequence is perfectly complementary to that of the mature miR-122, and its binding to this miRNA blocks its interactions with its targets, including HCV-RNA. No effect on the plasma levels of other miRNAs has been recorded. This ASO is also complementary to the precursors of miR-122 (pre-miR122 and pri-miR-122). It therefore blocks the biogenesis of miR-122, reducing its production, as it prevents dicer and drosha, key enzymes in miRNA biogenesis, from acting (Figure 2). Its administration to HCV-infected primates effectively decreases the viral RNA load (Lanford et al., 2010). Phase IIa trials in humans have also reported a decrease in viral RNA levels, but the RNA does not completely disappear (Janssen et al., 2013).

The potential value of the anti-miR approach probably lies in the weak induction of resistance, which has led to current trials testing miravirsen in combination with powerful antiviral drugs that would normally favor the emergence of resistance (Liu et al., 2016).

The obvious therapeutic value of this molecule led to the development of RG-101 (Regulus Therapeutics). Like miravirsen, RG101 is an anti-miR-122 agent. It differs from miravirsen in its chemical structure. It is an ASO phosphorothioate coupled to an N-acetylgalactosamine group (GalNac), to enhance uptake by hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor. Despite these significant improvements and the therapeutic effects observed (Van Der Ree et al., 2016), Regulus halted the development of the molecule in 2017, due, in particular, to its liver toxicity (increase in bilirubin levels). Despite these setbacks, there is still genuine enthusiasm for the development of anti-miRs, as demonstrated by the clinical trials currently underway (Figure 3) (reviewed in Chakraborty, Sharma, Sharma, Doss, & Lee, 2017).

1.3 | What can we target with ASOs?

Regardless of the mode of action, the target molecule is a coding or non-coding RNA.

1.3.1 | Coding RNAs

As previously described, ASOs may target coding RNAs through various modes of action. This strategy has been used for the treatment of familial homozygous hypercholesterolemia. Familial homozygous hypercholesterolemia is a rare genetic disease resulting in high concentrations of atherogenic LDL particles, which are involved in cholesterol transport. Mipomersen (Kynamro[®]) is an inhibitor of the synthesis of ApoB100 (Raal et al., 2010), the main component of LDLs and their precursors, VLDLs. The use of a 20-nucleotide 2'-O-methoxyethyl-modified phosphorothioate oligonucleotide (second-generation ASO) complementary to the coding region of the *ApoB100* mRNA leads to its degradation by RNase H. Mipomersen use over several weeks induces a progressive decrease of LDL-cholesterol levels (Akdin et al., 2011; Ricotta & Frishman, 2012). Mipomersen was developed and marketed by Ionis Pharmaceuticals, in collaboration with Genzyme Corporation. Following the demonstration of its efficacy in clinical trials, with only moderate adverse effects (influenza-like illness and skin reaction at the injection site), it was approved by the FDA in the United States in 2013 for the treatment of familial hypercholesterolemia in adults (Figure 2). Mipomersen is administered subcutaneously once per week (200 mg/week), and direct self-administration by the patient is possible. It is used in combination with other cholesterol-lowering drugs to improve treatment efficacy (Figure 3) (Akdin et al., 2011; Hair, Cameron, & McKeage, 2013; Santos et al., 2015).

1.3.2 | Non-coding RNAs

ASOs can also target non-coding RNAs (long non-coding RNA [lncRNA], miRNA, etc.), which, like coding RNAs, may cause disease. Angelman syndrome is a genetic neurological disorder characterized by severe motor and intellectual disability (Clayton-Smith & Laan, 2003). Several causal molecular abnormalities have been identified, all of which involve a lack of function of part of the maternal chromosome 15 (15q11-q13 region). The *UBE3A* gene is located in this region and plays a central role. When the *UBE3A* gene inherited from the mother carries a deleterious mutation or is not expressed, the patient develops Angelman syndrome, despite the presence of a normal but inactivated paternal copy. Releasing the inactivation of the paternal copy of the *UBE3A* gene constitute one possible treatment. Such inactivation is controlled by a lncRNA, *UBE3A-ATS* (*UBE3A*-antisense) (Mabb, Judson, Zylka, & Philpot, 2011; Rabinovitz, Kaufman, Ludwig, Razin, & Shemer, 2012). Meng et al. developed an ASO targeting *UBE3A-ATS* to restore the expression and activity of *UBE3A*. They used this approach in a mouse model and showed that a second-generation ASO (2'-MOE) complementary to the non-coding *UBE3A-ATS* RNA caused its degradation after the recruitment of RNase H. As the paternal copy of *UBE3A* is no longer repressed, the paternal *UBE3A* protein is produced, thereby restoring *UBE3A* function (Figure 3). The ASO appears to be well tolerated by mice. This strategy is promising and original. Similar developments in humans should be possible (Meng et al., 2015).

1.4 | Why should ASOs be preferred over conventional treatment

1.4.1 | Route of administration and tissue biodistribution

The best route of administration for an ASO is the one enabling it to reach its target. Indeed, the pharmacological profile of ASOs is largely influenced by their protein-binding capacity. These interactions depend principally on the chemical structure of the ASOs. ASO-PS have a high plasma protein-binding capacity (>90%), resulting in wide systemic distribution and possible uptake by target tissues and cells. Unfortunately, these interactions also contribute to the toxicity of ASOs. Chemical modifications designed to minimize these effects and increase the therapeutic index are currently being studied (Shen et al., 2019; Wang, Han, Sun, Chen, & Chen, 2019). ASO-PNA and ASO-MF, which are uncharged, are rapidly excreted in urine, limiting their tissue absorption. The coupling of these molecules to peptides (PPMO) increases their tissue biodistribution, as previously suggested (Jearawiriyapaisarn, Moulton, Sazani, Kole, & Willis, 2010).

Intravenous (iv) administration should be favored for systemic effects with the most recent generation of ASOs. This administration route maximizes the bioavailability of ASOs and leads to rapid distribution to highly irrigated organs (liver, kidney, spleen). By contrast, distribution is weak in the lungs, cardiac muscle, and skin, and negligible in adipose tissue. Nonetheless, iv administration is considered to be the optimal route for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (Exondis 51, as highlighted below) (Mendell et al., 2016) and modifications of these ASOs are currently being studied to optimize their biodistribution to the muscles through coupling to a fatty acid (Prakash et al., 2019) or peptide (Pip-6 PMO) (Figure 3) (Betts et al., 2012).

The subcutaneous (sc) route is an interesting alternative to the iv route, increasing the ease of administration, when possible. Inotersen (Tegsedi[®]), marketed by Ionis Pharmaceuticals and Akcea Therapeutics, has recently been licensed for sc administration in the United States, Canada, and Europe (Figure 2) (Keam, 2018). This drug is indicated for the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis (hATTR). This disease is caused by an autosomal-dominant mutation of the transthyretin (*TTR*) gene. Approximately 100 mutations of this gene have been described, associated with varying degrees of disease severity due to amyloid deposits in tissues and nerves. Such deposits lead to the progressive onset of cardiomyopathy, nephropathy, polyneuropathy, and gastrointestinal disorders (Connors, Lim, Prokaeva, Roskens, & Costello, 2003). As the liver is the principal organ that produces TTR, the standard treatment for hATTR is liver transplantation. However, in certain patients, the disease progresses to other organs, despite liver transplantation (Liepnieks, Zhang, & Benson, 2010). Inotersen is a second-generation 2'-O-methoxyethyl-modified ASO that inhibits liver synthesis of TTR. In clinical trials, this ASO has been shown to improve the quality of life of patients relative to placebo, regardless of the causal mutation and disease stage. Inotersen is administered subcutaneously and may be self-administered after instruction by healthcare staff (Benson et al., 2018). When sc administration is possible, ASOs offer a targeted solution, while minimizing the constraints of administration.

In parallel to systemic administration, ASOs can be administered locally, allowing direct and local targeting. Local administration can also reach compartments not accessible by iv or sc routes. This is true, in particular, for the administration of formivirsen (Vitravene[®]) to the eye (Vitravene Study Group, 2002). Intrathecal administration is also an interesting alternative route of administration for the central nervous system, as the blood-brain barrier is impermeable to ASOs. Therefore, only minute amounts of ASOs reach the brain after iv or sc administration (Phillips et al., 1997). Intrathecal administration results in significant bioavailability in the brain and spinal cord. The invasive nature of this route limits its use but it is still the only way ASOs can be used to treat neurological diseases. It allows direct targeting of the tissue, without systemic exposure, a major source of toxicity. It also avoids renal and hepatic elimination, resulting in local maintenance of the concentration of the molecule. These factors all make ASOs good candidates for the treatment of neurological diseases. Many molecules are currently in clinical trials, at various stages of evaluation, to obtain marketing authorization (Rinaldi & Wood, 2017). For example, Huntington's disease, like DM1, is a triplet-repeat disease, affecting the *huntingtin* gene. In the presence of abnormally expanded CAG repeats, toxic accumulation of the protein occurs (Ambrose et al., 1994), causing motor and cognitive disorders (Lawrence et al., 1996). The number of repeats correlates with age at the onset of symptoms, but not disease severity or progression (Duyao et al., 1993). ASOs that catalyze RNase H-mediated degradation of *huntingtin* mRNA decrease the production of the protein. Transient ASO infusion into the CNS therefore limits the progression of the disease in a mouse model and primates (Kordasiewicz et al., 2012).

ASOs can also be locally delivered by inhalation (nebulization). This is true for eluforsen in cystic fibrosis patients homozygous for the F508del-CFTR mutation (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). This molecule

restores the activity of the CFTR channel and, therefore, the respiratory function of treated patients (Drevinek et al., 2019; Sermet-Gaudelus et al., 2019). This route of administration is not invasive and self-administration should be possible.

Another very promising option to increase specific uptake independently of the route of administration is the conjugation of specific molecules to ASOs as mentioned previously (fatty acid, peptides or *N*-acetylgalactosamine) (reviewed in Benizri et al., 2019). One of the best examples thus far developed is the conjugation of an *N*-acetylgalactosamine (GalNac) moiety to the ASO. The GalNac receptor ligand specifically binds to the Asialoglycoprotein Receptor (ASGR), which is highly expressed at the surface of hepatocytes, substantially increasing the targeting of GalNac-ASO to the liver and its uptake (Tanowitz et al., 2017). The conjugation of triantennary *N*-acetylgalactosamine (GalNac3) makes ASOs up to 30 times more potent non-conjugated ASOs, supporting lower doses and increased safety (Crooke et al., 2019; Prakash et al., 2014). These ASOs thus hold great therapeutic potential for hepatic diseases, such as hepatocellular carcinoma among others (Y. Kim, Hu, et al., 2019). Indeed, several GalNac-conjugated oligonucleotides are undergoing pivotal clinical investigation (reviewed in Y. Huang, 2017). Very recently, a phase 2a trial, testing a GalNac3-conjugated ASO (referred as APO(a)-L_{RX}) that targets lipoprotein(a) mRNA (*LPA*), showed a significant dose-dependent reduction in lipoprotein(a) levels in patients with cardiovascular disease (ClinicalTrials.gov number, NCT03070782). This is a major breakthrough, as APO(a)-L_{RX} is the first and currently only drug in clinical development designed to selectively and robustly inhibit the production of Lp(a) (Tsimikas et al., 2020).

1.4.2 | Orphan genetic diseases

There is currently no cure for most orphan diseases. Antisense approaches would be a great asset for such diseases, as shown by the development of treatments for Duchenne muscular dystrophy (DMD) and very recently for neuronal ceroid lipofuscinosis 7 (CLN7).

DMD is a rare genetic disorder linked to the X chromosome. It affects between 1 in 3,500 and 1 in 6,000 newborn boys worldwide each year (Bushby et al., 2010; Emery, 1991). It is caused by nonsense mutations of the dystrophin gene. These deleterious mutations (deletions, insertions, and point mutations, resulting in a frameshift and the appearance of a premature stop codon) lead to the complete absence of dystrophin. Mutations have been found in all exons, but exons 47 to 63 are the most frequently affected (Flanigan et al., 2009).

Dystrophin is a structural protein of striated muscles that plays an essential role in maintaining muscle integrity. Defective dystrophin production has dramatic consequences for the patient. Indeed, children and young adults with DMD progressively develop severe neuromuscular deficiencies. They lose the ability to walk, and then suffer cardiorespiratory problems and damage to the muscles of the digestive tract. All these symptoms lead to the premature death of DMD patients (Brooke et al., 1989). There are other forms of dystrophy that are generally less severe than DMD, such as Becker's dystrophy (Muntoni, Torelli, & Ferlini, 2003). The Duchenne and Becker dystrophies have the same origin—alterations to the Xp21 locus—but the mutations found in Becker's dystrophy are less deleterious. The produced altered dystrophin protein remains partially functional (Bushby et al., 1993; Monaco, Bertelson, Liechti-Gallati, Moser, & Kunkel, 1988). The symptoms observed in patients with Becker dystrophy are highly heterogeneous. The most severely affected patients have symptoms similar to those seen in patients with DMD, but some patients are almost asymptomatic. Despite many years of research on these diseases, they remain incurable. Current treatments aim to slow disease progression and to preserve as many muscle fibers as possible.

The much more severe clinical presentation of DMD relative to Becker dystrophy led to the design of ASOs to generate a Becker-like phenotype in DMD patients. By forcing the exclusion of the exon carrying the deleterious mutation, it is possible to generate a partially functional truncated protein. In this situation, ASOs bind to the pre-mRNA at the splice site of the mutated exon. Several studies have been conducted to select candidate exons for exclusion (Aartsma-Rus et al., 2004; J. C. van Deutekom et al., 2007; J. C. T. van Deutekom et al., 2001). Several molecules are currently in clinical trials, including eteplirsen, marketed under the name Exondys 51[®] by Sarepta Therapeutics. After debates concerning its efficacy, eteplirsen was finally approved by the FDA in 2016. It is a third-generation ASO, a phosphorodiamidate morpholino oligomer (PMO), which does not allow RNase H activity. It hybridizes to the exon 51 splice site, leading to exon 51 skipping. Eteplirsen treatment simulates a milder form of dystrophy in the 13% of DMD patients carrying a deleterious mutation of exon 51. This ASO was injected (iv) once per week. After 36 months, eteplirsen-treated patients showed a lower incidence of loss of ambulation (Mendell et al., 2016). There are other ASOs targeting other exons that work in a similar manner. SRP-4053 (Golodirsen) targets exon 53 and SRP-4045

(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02500381) and PRO044 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01037309) target exon 45 (Ferlini et al., 2013). Although the targeted exons are different, the therapeutic strategy remains the same, and comparable development highlights the flexibility offered by the use of ASOs. These antisense therapies are particularly effective for decreasing clinical signs in skeletal muscle but have a limited effect on heart disease. Indeed, the heart is poorly irrigated, limiting the biodistribution of PMOs. New molecules, such as the antisense Pip6a-PMO, as previously mentioned, are being studied to target heart muscle. This molecule consists of an ASO coupled to peptides (peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomer (PPMO)). The peptide domain, rich in cationic amino acids (including arginine), adds a charge to the initially uncharged PMO, thereby increasing its bioavailability. These new molecules have been administered by the iv route to mice in a model of DMD. The preliminary results indicate an improvement in dystrophin production in the muscles, including the heart, through the same mode of action: exon skipping (Blain et al., 2018).

Other innovative and targeted therapies are also being tested. They involve the use of exogenous synthetic dystrophin produced by a modified adenovirus (AAV). This strategy is, however, limited by the intrinsic packaging capacity of these viruses, which can hold, at most, only one third of the dystrophin sequence. Recent studies have been conducted with lentiviruses (Counsell et al., 2017). In parallel, cell therapies involving the use of stem cells to promote cell regeneration are also being investigated (reviewed Sienkiewicz, Okurowska Zawada, Paszko Patej, Kawnik, & Kulak, 2015). Although promising, these strategies are still experimental. It is hoped that it will be possible to use them to treat DMD patients. They will probably be used with ASOs to improve their efficacy (Figure 3).

Very recently, outstanding results were obtained with a tailor-made ASO, developed in record time and specifically designed for a single patient with neuronal ceroid lipofuscinosis 7 (CLN7), a form of Batten's disease (Y. Kim, Hu, et al., 2019). This is a rare autosomal recessive disorder that affects the nervous system, with the mean age of patients at onset of 3.3 years and a fatal outcome. Genetic testing of the patient revealed a single pathogenic heterozygous mutation in the *CLN7* gene (also known as *MFSB8*) and an SVA (SINE-VNTR-ALU) retrotransposon insertion in the second allele. The SVA insertion affects splicing of the nearby gene, inducing mis-splicing of exon 6 of *CLN7*. 22-nucleotide ASOs (phosphorothioate and 2'-O-methoxyethyl, same backbone and sugar chemistry modifications as nusinersen) were designed and tested in patient fibroblasts to restore the altered splicing. The most effective were retained for further development. This patient-customized ASO was named Milasen. The urgency of the patient's clinical state sped up toxicological evaluation. After obtaining FDA authorization and institutional review board approval, the investigators administered the compound intrathecally to the patient in ascending doses, as for nusinersen, which had been safely administered to infants with SMA (Finkel et al., 2017). There were no serious adverse events during the first year of treatment. The efficacy of the treatment was associated with an objective reduction in seizures (J. Kim, Jo, et al., 2019). This study strongly demonstrates how ASOs can be used as a component of individualized genomic medicine (Figure 2).

1.4.3 | Cancer

Targeted therapies have revolutionized cancer management by making it possible to specifically target the genetic abnormalities that cause or play a major role in tumor development. Major therapeutic successes have been obtained with inhibitors that specifically target constitutively active tyrosine kinases, such as specific inhibitors of the constitutively active form of the BRAF kinase (BRAF-V600) in BRAF-V600 mutated metastatic melanoma (Chapman et al., 2011). The use of blocking antibodies specific for an oncogenic pathway has also resulted in therapeutic success (anti-EGFR antibody in metastatic colon cancer and anti-HER2 in breast cancer with HER-2 amplification) (Li et al., 2017; Ross et al., 2009). ASOs are particularly interesting and appropriate tools in cancer treatment because of the versatility of their action and the possibility of generating ASOs specific for target sequences. As previously mentioned, they can be used not only to decrease the expression of coding oncogenic drivers but can also target non-coding RNAs. However, despite several attempts and ongoing trials, none of these compounds have yet obtained marketing authorization for use in oncology. Several ASOs targeting key oncogenic actors are currently in clinical trials (phase I-III).

Danvatirsen (AZD9150 and IONOS-STAT3-2.5) was designed to reduce the production of STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). STAT3 plays a key role in transducing signals that promote cell growth and survival, and is thus a potential drug target for several types of cancer (hematological, lung, breast, colorectal, etc.) (Hong et al., 2015; Reilly et al., 2018). Furthermore, the combination of AZD9150 with conventional chemotherapy for the treatment of neuroblastoma decreases tumorigenicity and increases chemosensitivity (Odate et al., 2017). Other trials of

combinations of AZD9150 with immunotherapy (anti-PD-L1), with or without conventional chemotherapy, are also underway (phase II trials, NCT029883578, NCT03421353).

Trabedersen (OT-101), a phosphorothioate ASO, targets the transforming growth factor beta (TGF- β) pathway. Trabedersen specifically targets TGF- β 2, which plays a key role in the late stages of tumor development (epithelial-mesenchymal transition, EMT). Several phase I/II clinical trials have evaluated the utility of this ASO to treat high-grade gliomas. Although unsuccessful, these trials made it possible to evaluate the safety of this ASO and its administration. Promising results have also been obtained for the treatment of advanced pancreatic cancer (reviewed in Takakura et al., 2019).

Custirsen (OGX-011), a second-generation ASO, targets the clusterin mRNA. Clusterin is a stress-dependent chaperone protein. Its anti-apoptotic activity promotes the development of resistance to anticancer treatments. Clusterin inhibition therefore potentiates the therapeutic activity of conventional chemotherapies (Zhang, Ge, Zhu, & Salaita, 2014). Unlike the previous examples, Custirsen would therefore render the tumors of patients more sensitive to chemotherapy. However, it yielded no significant improvement in overall survival in a phase III trial on metastatic prostate cancer when used in combination with conventional first-line treatment (docetaxel [Taxotere[®]] and prednisolone). Nevertheless, a *post-hoc* analysis highlighted an improvement in overall survival for a subgroup of patients with a poor prognosis (Chi et al., 2017).

Apatorsen (OGX-427), a second-generation ASO, targets another chaperone protein, heat-shock protein 27 (Hsp27). Hsp27 levels are very high in some cancers and this is associated with a poor prognosis. The inhibition of Hsp27 decreases tumor growth and sensitizes the tumor to cytotoxic chemotherapies. The preliminary results of a phase II trial assessing docetaxel alone or in combination with apatorsen for the treatment of metastatic urothelial carcinoma showed a slight increase in overall survival in the combination group. These results are promising and require confirmation (Rosenberg et al., 2019).

Many developments are still at the preclinical stage. Original ASO-based treatments have been proposed for very aggressive cancers for which there are currently few or no effective strategies. For example, the group of Obika recently proposed an original therapeutic strategy to restore the activity of a tumor suppressor in small-cell lung cancer (Rudin et al., 2019; Shimojo et al., 2019). Molecular data showed an increase in the expression of the SR/SR4 splicing regulator (Ser/Arg repetitive matrix 4), causing abnormal splicing of the tumor suppressor REST (RE1-silencing transcription factor) (Westbrook et al., 2005). The non-active, spliced form competes with the normal form and inhibits its tumor suppressor activity (Shimojo, Paquette, Anderson, & Hersh, 1999). A gapmer: LNA-type ASO specifically targeting the SRRM4 splice regulator abolished or decreased the inappropriate splicing of the REST tumor suppressor. This ASO, which was shown to be effective *in vivo* (mouse model), is of therapeutic interest, particularly as its effectiveness can be monitored with a plasma marker (Shimojo et al., 2019).

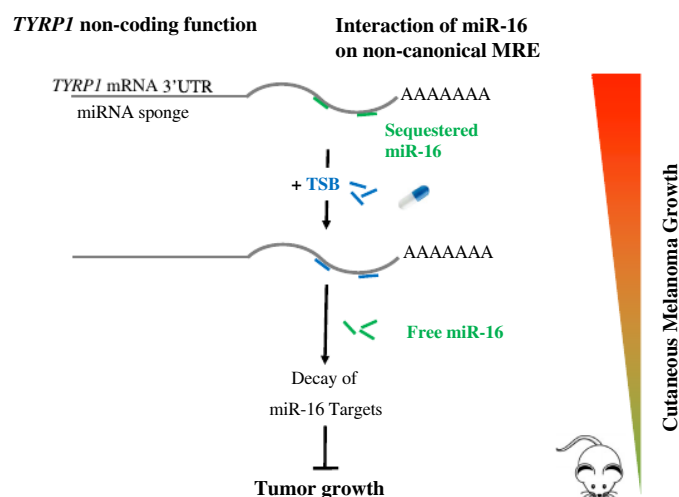
In parallel to these approaches aiming to modify the expression of oncogenic coding molecules, several ASOs have been designed to target non-coding RNAs. In particular, lnc-RNAs, and miRNAs have emerged as important regulators of the various phases controlling tumor transformation and progression. These non-coding RNAs are, therefore, prime targets for ASOs (Huarte, 2015; Ling, Fabbri, & Calin, 2013; Rupaimoole & Slack, 2017).

The lnc-RNAs of interest include *MALAT-1* (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1). Decreasing *MALAT-1* levels with an ASO significantly inhibits tumor growth and metastasis in lung and breast cancers (Arun et al., 2016; Gutschner et al., 2013).

The *SAMMSON* pro-tumoral lnc-RNA is co-amplified with the melanocyte-specific *MITF* gene in 10% of metastatic melanomas. Importantly, 90% of melanomas specifically express *SAMMSON*, which is not expressed in healthy cells. *SAMMSON* is thus a specific target of interest. The pro-tumor activity of *SAMMSON* is based on its interaction with the p32 protein, a major regulator of mitochondrial activity and metabolism. The use of a *SAMMSON*-specific gapmer reduced the clonogenicity of cells expressing *SAMMSON*, regardless of the genetic status of the tumor (mutations of *BRAF*, *NRAS*, *TP53*). *In vivo*, the potential therapeutic value of these gapmers has been demonstrated in PDX models (patient-derived xenografts) (Figure 2) (Leucci et al., 2016).

Our group also developed an original antisense strategy for the treatment of metastatic melanoma following the discovery of a novel mechanism of miRNA sequestration (Figure 2) (Gilot et al., 2017; Migault, Donnou-Fournet, Galibert, & Gilot, 2017). As previously described, the canonical silencing activity of miRNAs requires perfect base pairing between the seed region (2nd to 7th nucleotide) of the miRNA and that of the MRE on the mRNA (Bartel, 2004). The base complementarity between the miRNA and mRNA can, however, be imperfect, leading to non-canonical interactions. These interactions lack miRNA silencing activity. Our work is based on the identification of non-canonical interactions between miR-16 and the *tyrosinase-related protein 1* (*TYRP1*) mRNA. *TYRP1* is specifically expressed in the melanocyte lineage and

FIGURE 4 Inhibition of *TYRP1* miRNA sponge activity as a therapeutic strategy



is highly expressed in melanoma. We identified three non-canonical MREs for miR-16 in the 3' UTR of *TYRP1*. These non-canonical MRE-16s provide a non-coding function to *TYRP-1* mRNA, which acts as a miRNA-sponge. Indeed, such non-canonical binding results in the sequestration of miR-16, with delayed or no *TYRP1* mRNA degradation. As miR-16 has tumor suppressor activity in cutaneous melanoma, its sequestration promotes tumor growth. In this context, we designed ASOs to prevent such sequestration. They consist of target-site blockers (TSB): a third-generation ASO, consisting of a mixmer of DNA and LNA, with no RNase H activity. These TSBs were designed to be specific for *TYRP1* mRNA, hybridizing to *TYRP1* in place of miR-16. As they are perfectly complementary to the *TYRP1* mRNA along their entire length, their affinity for *TYRP1* mRNA is greater than that of miR-16. TSB displaces miR-16, allowing the redirection of miR-16 to other targets. The tumor suppressor activity of miR-16 is thus restored. These TSBs were shown to be effective *in vivo* in a PDX model. This specific and ground-breaking treatment strategy can restore the activity of miR-16 exclusively in cells expressing *TYRP1*. This innovation circumvents the need for a synthetic microRNA, which through its systemic effects, would have consequences throughout the body (Figures 3 and 4).

2 | CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Improvements in molecular knowledge and understanding the mechanisms underlying disease-development has made possible the shift from therapeutic approaches towards personalized medicine. At the same time, high throughput sequencing has made it possible to perform powerful molecular diagnoses required for the characterization of gene alterations and the implementation of targeted therapies. Together, these approaches have led to the refinement of diagnoses and prognostic analyses for patients and their diseases, and selection of the patients most likely to respond to treatment.

In this context, ASOs are powerful tools that directly target RNA. Through a non-exhaustive set of pioneering examples, we show here that ASOs can be used to treat many diseases caused by diverse genetic alterations and molecular programs. These diseases include neurodegenerative disorders and cancer, both major public health issues, as rare diseases currently lacking effective treatment. ASOs offer great flexibility of use, targeting coding and non-coding RNAs, with diverse mechanism of action. They may act as splicing modulators, increase or diminish RNA and protein levels, and mask or disrupt miRNA and protein sequestration. Indeed, their chemistry can be adapted to modulate their effect (w/ or w/o RNase H activity) and bioavailability and, importantly, their sequence can be adapted to genetic alterations. The fact that ASO can be customized in a sequence-specific fashion to match patient disorders was recently strongly underscored with the splice-switch ASO Milasen (J. Kim, Jo, et al., 2019). This example of successful drug-development and treatment within 1 year after first contact with the patient is probably the most advanced example of personalized medicine. Such spectacular development is still experimental and may require further exploration with careful examination of clinical and ethical issues.

Important chemical developments have been made to diminish the toxicity of ASOs, and the most representative molecules of these chemical classes are well tolerated. However, substantial toxicity may still be observed when they are used chronically. This may be an important drawback that should be lessened by the development of conjugated-ASOs that promote cell-specific uptake.

ASOs may be used in monotherapy or in combination with conventional approaches. They are therefore both an alternative for diseases with no effective available treatments and an option for use in patients with refractory diseases, as second- or third-line treatments.

In conclusion, the phrases “Targeting the Untargetable” and “Treating the Untreatable” summarize the potential of ASO strategies, thus revolutionizing personalized medicine.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Gene Expression and Oncogenesis team especially Nina Tardif and the Institute of Genetics and Development of Rennes (UMR6290 CNRS) for helpful discussions. This study received financial support from the following: University of Rennes, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Institut National du Cancer PAIR Melanoma program, SATT Ouest Valorization, Ligue National Contre le Cancer (LNCC), Départements du Grand-Ouest, and ARC cancer care Foundation. A. Q. and E. D. received a PhD fellowship from LNCC. A. F. was supported by the Region Bretagne and the University-Hospital Federation of Cancer Microenvironment and Innovation (CHU—FHU CAMin).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Anais M. Quemener: Conceptualization; writing-review and editing. **Laura Bachelot:** Conceptualization; writing-review and editing. **Anne Forestier:** Writing-review and editing. **Emmanuelle Donnou-Fournet:** Writing-review and editing. **David Gilot:** Writing-review and editing. **Marie-Dominique Galibert:** Conceptualization; funding acquisition; writing-review and editing.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflicts of interest for this article.

ORCID

Marie-Dominique Galibert  <https://orcid.org/0000-0003-0095-742X>

RELATED WIREs ARTICLES

[Natural antisense transcripts in diseases: From modes of action to targeted therapies](#)

[Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics](#)

[Splicing and neurodegeneration: Insights and mechanisms](#)

FURTHER READING

Lian, Y.-F., Huang, Y.-L., Wang, J.-L., Deng, M.-H., Xia, T.-L., Zeng, M.-S., ... Huang, Y.-H. (2018). Anillin is required for tumor growth and regulated by miR-15a/miR-16-1 in HBV-related hepatocellular carcinoma. *Aging*, *10*(8), 1884–1901. <https://doi.org/10.18632/aging.101510>

REFERENCES

- Aartsma-Rus, A., Janson, A. A. M., Kaman, W. E., Bremmer-Bout, M., van Ommen, G.-J. B., den Dunnen, J. T., & van Deutekom, J. C. T. (2004). Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *The American Journal of Human Genetics*, *74*(1), 83–92. <https://doi.org/10.1086/381039>
- Akdim, F., Tribble, D. L., Flaim, J. D., Yu, R., Su, J., Geary, R. S., ... Kastelein, J. J. P. (2011). Efficacy of apolipoprotein B synthesis inhibition in subjects with mild-to-moderate hyperlipidaemia. *European Heart Journal*, *32*(21), 2650–2659. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr148>
- Amantana, A., & Iversen, P. (2005). Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Current Opinion in Pharmacology*, *5*(5), 550–555. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.07.001>
- Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Barnes, G., Bates, G. P., Lin, C. S., Srinidhi, J., ... MacDonald, M. E. (1994). Structure and expression of the Huntington's disease gene: Evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, *20*(1), 27–38. <https://doi.org/10.1007/BF02257483>
- Arun, G., Diermeier, S., Akerman, M., Chang, K.-C., Wilkinson, J. E., Hearn, S., ... Spector, D. L. (2016). Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes & Development*, *30*(1), 34–51. <https://doi.org/10.1101/gad.270959.115>

- Bartel, D. P. (2004, January 23). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, *116*, 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136*(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Benizri, S., Gissot, A., Martin, A., Viallet, B., Grinstaff, M. W., & Barthélémy, P. (2019, February 20). Bioconjugated oligonucleotides: Recent developments and therapeutic applications. *Bioconjugate Chemistry*, *30*, 366–383. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00761>
- Benson, M. D., Waddington-Cruz, M., Berk, J. L., Polydefkis, M., Dyck, P. J., Wang, A. K., ... Coelho, T. (2018). Inotersen treatment for patients with hereditary transthyretin amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, *379*(1), 22–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716793>
- Betts, C., Saleh, A. F., Arzumanov, A. A., Hammond, S. M., Godfrey, C., Coursindel, T., ... Wood, M. J. (2012). Pip6-PMO, a new generation of peptide-oligonucleotide conjugates with improved cardiac exon skipping activity for DMD treatment. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, *1*, e38. <https://doi.org/10.1038/MTNA.2012.30>
- Binaschi, M., Zunino, F., & Capranico, G. (1995). Mechanism of action of DNA topoisomerase inhibitors. *Stem Cells*, *13*(4), 369–379. <https://doi.org/10.1002/stem.5530130408>
- Biogen. (2019, April 1). Nusinersen. *Australian Prescriber*, *42*, 75–76. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2019.019>
- Blain, A. M., Grealley, E., McClorey, G., Manzano, R., Betts, C. A., Godfrey, C., ... Straub, V. W. (2018). Peptide-conjugated phosphodiarnidate oligomer-mediated exon skipping has benefits for cardiac function in mdx and Cmah^{-/-}mdx mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*, *13*(6), e0198897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198897>
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., ... Housman, D. E. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, *68*(4), 799–808. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5)
- Brooke, M. H., Fenichel, G. M., Griggs, R. C., Mendell, J. R., Moxley, R., Florence, J., ... Schierbecker, J. (1989). Duchenne muscular dystrophy: Patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology*, *39*(4), 475–481.
- Browning, J. S., Rice, R. M., Lee, W. V., & Baker, L. M. (1947). Gold therapy in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, *237*(12), 428–431. <https://doi.org/10.1056/NEJM194709182371202>
- Bushby, K. M. D., Gardner-Medwin, D., Nicholson, L. V. B., Johnson, M. A., Haggerty, I. D., Cleghorn, N. J., ... Bhattacharyal, S. S. (1993). The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. *Journal of Neurology*, *240*(2), 105–112. <https://doi.org/10.1007/BF00858726>
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., ... Constantin, C. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: Diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, *9*(1), 77–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6)
- Campbell, J. M., Bacon, T. A., & Wickstrom, E. (1990). Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *20*(3), 259–267. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(90\)90084-P](https://doi.org/10.1016/0165-022X(90)90084-P)
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., ... Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, *467*(7313), 318–322. <https://doi.org/10.1038/nature09328>
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., Doss, C. G. P., & Lee, S.-S. (2017). Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from bench to clinic as next generation medicine. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *8*, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.005>
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., ... BRIM-3 Study Group. (2011). Improved survival with Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*, *364*(26), 2507–2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>
- Chi, K. N., Higano, C. S., Blumenstein, B., Ferrero, J. M., Reeves, J., Feyerabend, S., ... de Bono, J. S. (2017). Custirsen in combination with docetaxel and prednisone for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (SYNERGY trial): A phase 3, multicentre, open-label, randomised trial. *The Lancet Oncology*, *18*(4), 473–485. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30168-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30168-7)
- Clayton-Smith, J., & Laan, L. (2003). Angelman syndrome: A review of the clinical and genetic aspects. *Journal of Medical Genetics*, *40*(2), 87–95. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.2.87>
- Cocco, E., Scaltriti, M., & Dilon, A. (2018). NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *15*(12), 731–747. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0113-0>
- Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., & Hobbs, H. H. (2006). Sequence variations in PCSK9, Low LDL, and protection against coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*, *354*(12), 1264–1272. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054013>
- Connors, L. H., Lim, A., Prokaeva, T., Roskens, V. A., & Costello, C. E. (2003). Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. *Amyloid*, *10*(3), 160–184. <https://doi.org/10.3109/13506120308998998>
- Counsell, J. R., Asgarian, Z., Meng, J., Ferrer, V., Vink, C. A., Howe, S. J., ... Danos, O. (2017). Lentiviral vectors can be used for full-length dystrophin gene therapy. *Scientific Reports*, *7*(1), 79. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00152-5>
- Crooke, S. T., Baker, B. F., Xia, S., Yu, R. Z., Viney, N. J., Wang, Y., ... Geary, R. S. (2019). Integrated assessment of the clinical performance of GalNAc₃-conjugated 2'-O-methoxyethyl chimeric antisense oligonucleotides: I. human volunteer experience. *Nucleic Acid Therapeutics*, *29*(1), 16–32. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0753>
- Disney, M. D., Dwyer, B. G., & Childs-Disney, J. L. (2018). Drugging the RNA world. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(11), a034769. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034769>

- Dominski, Z., & Kole, R. (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), 8673–8677. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8673>
- Drevinek, P., Pressler, T., Cipolli, M., De Boeck, K., Schwarz, C., Bouisset, F., ... Elborn, J. S. (2019). Antisense oligonucleotide eluforsen is safe and improves respiratory symptoms in F508DEL cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 19, 99–107. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2019.05.014>
- Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., ... MacDonald, M. (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature Genetics*, 4(4), 387–392. <https://doi.org/10.1038/ng0893-387>
- Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., ... Nielsen, P. E. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, 365(6446), 566–568. <https://doi.org/10.1038/365566a0>
- Emery, A. E. H. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—A world survey. *Neuromuscular Disorders*, 1(1), 19–29. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(91\)90039-U](https://doi.org/10.1016/0960-8966(91)90039-U)
- Ferlini, A., Goemans, N., Tulinius, M., Niks, E. H., Dorrictot, S., Morgan, A., ... Campion, G. (2013). T.I.2 exon skipping and PRO044 in Duchenne muscular dystrophy: Extending the program. *Neuromuscular Disorders*, 23(9–10), 847. <https://doi.org/10.1016/J.NMD.2013.06.718>
- Finkel, R. S., Mercuri, E., Darras, B. T., Connolly, A. M., Kuntz, N. L., Kirschner, J., ... De Vivo, D. C. (2017). Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *New England Journal of Medicine*, 377(18), 1723–1732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fitzgerald, K., White, S., Borodovsky, A., Bettencourt, B. R., Strahs, A., Clausen, V., ... Simon, A. (2017). A highly durable RNAi therapeutic inhibitor of PCSK9. *New England Journal of Medicine*, 376(1), 41–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609243>
- Flanigan, K. M., Dunn, D. M., von Niederhausern, A., Soltanzadeh, P., Gappmaier, E., Howard, M. T., ... Weiss, R. B. (2009). Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: Application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Human Mutation*, 30(12), 1657–1666. <https://doi.org/10.1002/humu.21114>
- Frischmeyer, P. A., & Dietz, H. C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 8(10), 1893–1900. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.10.1893>
- Furdon, P. J., Dominski, Z., & Kole, R. (1989). RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds. *Nucleic Acids Research*, 17(22), 9193–9204. <https://doi.org/10.1093/nar/17.22.9193>
- Geary, R. S., Henry, S. P., & Grillone, L. R. (2002). Fomivirsen. *Clinical Pharmacokinetics*, 41(4), 255–260. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241040-00002>
- Gilot, D., Migault, M., Bachelot, L., Journé, F., Rogiers, A., Donnou-Fournet, E., ... Galibert, M.-D. (2017). A non-coding function of TYRP1 mRNA promotes melanoma growth. *Nature Cell Biology*, 19, 1348–1357. <https://doi.org/10.1038/ncb3623>
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., ... Garcia, L. (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nature Medicine*, 21(3), 270–275. <https://doi.org/10.1038/nm.3765>
- Gupta, N., Fisker, N., Asselin, M.-C., Lindholm, M., Rosenbohm, C., Ørum, H., ... Straarup, E. M. (2010). A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo. *PLoS One*, 5(5), e10682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010682>
- Gutschner, T., Hammerle, M., Eissmann, M., Hsu, J., Kim, Y., Hung, G., ... Diederichs, S. (2013). The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Research*, 73(3), 1180–1189. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2850>
- Hagedorn, P. H., Persson, R., Funder, E. D., Albæk, N., Diemer, S. L., Hansen, D. J., ... Koch, T. (2018). Locked nucleic acid: Modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discovery Today*, 23(1), 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.018>
- Haghighat Jahromi, A., Honda, M., Zimmerman, S. C., & Spies, M. (2013). Single-molecule study of the CUG repeat–MBNL1 interaction and its inhibition by small molecules. *Nucleic Acids Research*, 41(13), 6687–6697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt330>
- Hair, P., Cameron, F., & McKeage, K. (2013). Mipomersen sodium: First global approval. *Drugs*, 73(5), 487–493. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0042-2>
- Harigaya, Y., & Parker, R. (2010, July). No-go decay: A quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1, 132–141. <https://doi.org/10.1002/wrna.17>
- Heisterkamp, N., Morris, C., Sender, L., Knoppel, E., Uribe, L., Cui, M. Y., & Groffen, J. (1990). Rearrangement of the human ABL oncogene in a glioblastoma. *Cancer Research*, 50(11), 3429–3434.
- Hong, D., Kurzrock, R., Kim, Y., Woessner, R., Younes, A., Nemunaitis, J., ... MacLeod, A. R. (2015). AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer. *Science Translational Medicine*, 7(314), 314ra185. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5272>
- Hua, Y., Sahashi, K., Hung, G., Rigo, F., Passini, M. A., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2010). Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes & Development*, 24(15), 1634–1644. <https://doi.org/10.1101/gad.1941310>
- Hua, Y., Sahashi, K., Rigo, F., Hung, G., Horev, G., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2011). Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature*, 478(7367), 123–126. <https://doi.org/10.1038/nature10485>
- Huang, L., Low, A., Damle, S. S., Keenan, M. M., Kuntz, S., Murray, S. F., ... Guo, S. (2018). Antisense suppression of the nonsense mediated decay factor Upf3b as a potential treatment for diseases caused by nonsense mutations. *Genome Biology*, 19(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1386-9>

- Huang, Y. (2017, March 17). Preclinical and clinical advances of GalNAc-decorated nucleic acid therapeutics. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 6, 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2016.12.003>
- Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1253–1261. <https://doi.org/10.1038/nm.3981>
- Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., & Ohtsuka, E. (1987). Synthesis and hybridization studies on two complementary nona (2'-o-methyl)ribonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 15(15), 6131–6148. <https://doi.org/10.1093/nar/15.15.6131>
- Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., ... Hodges, M. R. (2013). Treatment of HCV infection by targeting MicroRNA. *New England Journal of Medicine*, 368(18), 1685–1694. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209026>
- Jearawiriyapaisarn, N., Moulton, H. M., Sazani, P., Kole, R., & Willis, M. S. (2010). Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers. *Cardiovascular Research*, 85(3), 444–453. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp335>
- Jordan, V. C. (2003). Tamoxifen: A most unlikely pioneering medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(3), 205–213. <https://doi.org/10.1038/nrd1031>
- Kantarjian, H. M., & Talpaz, M. (2001). Imatinib mesylate: Clinical results in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Seminars in Oncology*, 28, 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0093-7754\(01\)90098-3](https://doi.org/10.1016/S0093-7754(01)90098-3)
- Kaufmann, K. B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A., & Grez, M. (2013). Gene therapy on the move. *EMBO Molecular Medicine*, 5(11), 1642–1661. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202287>
- Keam, S. J. (2018). Inotersen: First global approval. *Drugs*, 78(13), 1371–1376. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0968-5>
- Khvorova, A., & Watts, J. K. (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology*, 35(3), 238–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>
- Kim, J., Hu, C., El Achkar, C. M., Black, L. E., Douville, J., Larson, A., ... Yu, T. W. (2019). Patient-customized oligonucleotide therapy for a rare genetic disease. *New England Journal of Medicine*, 381(17), 1644–1652. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813279>
- Kim, Y., Jo, M., Schmidt, J., Luo, X., Prakash, T. P., Zhou, T., ... MacLeod, A. R. (2019). Enhanced potency of GalNAc-conjugated antisense oligonucleotides in hepatocellular Cancer models. *Molecular Therapy*, 27(9), 1547–1557. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.06.009>
- Kordasiewicz, H. B., Stanek, L. M., Wancewicz, E. V., Mazur, C., McAlonis, M. M., Pytel, K. A., ... Cleveland, D. W. (2012). Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron*, 74(6), 1031–1044. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.009>
- Koziolekiewicz, M., Gendaszewska, E., Maszewska, M., Stein, C. A., Stec, W. J., Morschhauser, F., & Martiat, P. (2001). The mononucleotide-dependent, nonantisense mechanism of action of phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotides depends upon the activity of an ecto-5'-nucleotidase. *Blood*, 98(4), 995–1002. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.4.995>
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 438(7068), 685–689. <https://doi.org/10.1038/nature04303>
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry*, 270(8), 1628–1644.
- Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., ... Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 327(5962), 198–201. <https://doi.org/10.1126/science.1178178>
- Langlois, M.-A., Lee, N. S., Rossi, J. J., & Puymirat, J. (2003). Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 7(5 Pt 1), 670–680. [https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(03\)00068-6](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(03)00068-6)
- Lawrence, A. D., Sahakian, B. J., Hodges, J. R., Rosser, A. E., Lange, K. W., & Robbins, T. W. (1996). Executive and mnemonic functions in early Huntington's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 119(Pt 5), 1633–1645.
- Lee, M.-H., Yang, H.-I., Yuan, Y., L'Italien, G., & Chen, C.-J. (2014). Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(28), 9270–9280. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9270>
- Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., ... Marine, J.-C. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature*, 531(7595), 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature17161>
- Li, D., Fu, Q., Li, M., Li, J., Yin, C., Zhao, J., & Li, F. (2017). Primary tumor site and anti-EGFR monoclonal antibody benefit in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Future Oncology*, 13(12), 1115–1127. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0468>
- Liang, X. H., Nichols, J. G., Hsu, C. W., Vickers, T. A., & Crooke, S. T. (2019). mRNA levels can be reduced by antisense oligonucleotides via no-go decay pathway. *Nucleic Acids Research*, 47(13), 6900–6916. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz500>
- Liang, X. H., Shen, W., Sun, H., Migawa, M. T., Vickers, T. A., & Crooke, S. T. (2016). Translation efficiency of mRNAs is increased by antisense oligonucleotides targeting upstream open reading frames. *Nature Biotechnology*, 34(8), 875–880. <https://doi.org/10.1038/nbt.3589>
- Liang, X., Sun, H., Shen, W., Wang, S., Yao, J., Migawa, M. T., ... Crooke, S. T. (2017). Antisense oligonucleotides targeting translation inhibitory elements in 5' UTRs can selectively increase protein levels. *Nucleic Acids Research*, 45(16), 9528–9546. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx632>
- Liepnieks, J. J., Zhang, L. Q., & Benson, M. D. (2010). Progression of transthyretin amyloid neuropathy after liver transplantation. *Neurology*, 75(4), 324–327. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ea15d4>
- Ling, H., Fabbri, M., & Calin, G. A. (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(11), 847–865. <https://doi.org/10.1038/nrd4140>
- Liu, F., Shimakami, T., Murai, K., Shirasaki, T., Funaki, M., Honda, M., ... Kaneko, S. (2016). Efficient suppression of hepatitis C virus replication by combination treatment with miR-122 antagonism and direct-acting antivirals in cell culture systems. *Scientific Reports*, 6(1), 30939. <https://doi.org/10.1038/srep30939>

- Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J., & Witte, O. N. (1990). Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*, *247*(4946), 1079–1082. <https://doi.org/10.1126/science.2408149>
- Mabb, A. M., Judson, M. C., Zylka, M. J., & Philpot, B. D. (2011). Angelman syndrome: Insights into genomic imprinting and neurodevelopmental phenotypes. *Trends in Neurosciences*, *34*(6), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.04.001>
- Mansoor, M., & Melendez, A. J. (2008). Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene Regulation and Systems Biology*, *2*, 275–295.
- Martini, M., Vecchione, L., Siena, S., Tejpar, S., & Bardelli, A. (2012). Targeted therapies: How personal should we go? *Nature Reviews Clinical Oncology*, *9*(2), 87–97. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.164>
- Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(2), 108–121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
- McCall, A. L., & Farhy, L. S. (2013). Treating type 1 diabetes: From strategies for insulin delivery to dual hormonal control. *Minerva Endocrinologica*, *38*(2), 145–163.
- Mello, C. C., & Conte, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*, *431*(7006), 338–342. <https://doi.org/10.1038/nature02872>
- Mendell, J. R., Goemans, N., Lowes, L. P., Alfano, L. N., Berry, K., Shao, J., ... Eteplirsen Study Group and Telethon Foundation DMD Italian Network. (2016). Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, *79*(2), 257–271. <https://doi.org/10.1002/ana.24555>
- Meng, L., Ward, A. J., Chun, S., Bennett, C. F., Beaudet, A. L., & Rigo, F. (2015). Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature*, *518*(7539), 409–412. <https://doi.org/10.1038/nature13975>
- Mercuri, E., Darras, B. T., Chiriboga, C. A., Day, J. W., Campbell, C., Connolly, A. M., ... Finkel, R. S. (2018). Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *New England Journal of Medicine*, *378*(7), 625–635. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710504>
- Messina, A., Langlet, F., Chachlaki, K., Roa, J., Rasika, S., Jouy, N., ... Prevet, V. (2016). A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nature Neuroscience*, *19*(6), 835–844. <https://doi.org/10.1038/nn.4298>
- Migault, M., Donnou-Fournet, E., Galibert, M.-D., & Gilot, D. (2017). Definition and identification of small RNA sponges: Focus on miRNA sequestration. *Methods*, *117*, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2016.11.012>
- Miller, H. I., Riggs, A. D., & Gill, G. N. (1973). Ribonuclease H (hybrid) in *Escherichia coli*. Identification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, *248*(7), 2621–2624.
- Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., & Kunkel, L. M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, *2*(1), 90–95.
- Monia, B. P., Lesnik, E. A., Gonzalez, C., Lima, W. F., McGee, D., Guinosso, C. J., ... Freier, S. M. (1993). Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(19), 14514–14522.
- Mulders, S. A. M., van den Broek, W. J. A. A., Wheeler, T. M., Croes, H. J. E., van Kuik-Romeijn, P., de Kimpe, S. J., ... Wansink, D. G. (2009). Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(33), 13915–13920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905780106>
- Muntoni, F., Torelli, S., & Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet Neurology*, *2*(12), 731–740. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00585-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00585-4)
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric Chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, *2*(4), 279–289. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G., & Coppa, A. (2017). The role of peroxiredoxins in cancer. *Molecular and Clinical Oncology*, *6*(2), 139–153. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1129>
- Nielsen, P., Egholm, M., Berg, R., & Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, *254*(5037), 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1962210>
- Noll, D. M., Mason, T. M., & Miller, P. S. (2006). Formation and repair of Interstrand cross-links in DNA. *Chemical Reviews*, *106*(2), 277–301. <https://doi.org/10.1021/cr040478b>
- Odate, S., Veschi, V., Yan, S., Lam, N., Woessner, R., & Thiele, C. J. (2017). Inhibition of *STAT3* with the generation 2.5 antisense oligonucleotide, AZD9150, decreases neuroblastoma tumorigenicity and increases chemosensitivity. *Clinical Cancer Research*, *23*(7), 1771–1784. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1317>
- Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J., & Cooper, T. A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(7), 2646–2651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708519105>
- Pelaia, G., Canonica, W., Matucci, A., Paolini, R., Triggiani, M., & Paggiaro, P. (2017). Targeted therapy in severe asthma today: Focus on immunoglobulin E. *Drug Design, Development and Therapy*, *11*, 1979–1987. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S130743>
- Perry, C. M., & Barman Balfour, J. A. (1999). Fomivirsin. *Drugs*, *57*(3), 375–380. <https://doi.org/10.2165/00003495-199957030-00010>
- Phillips, J. A., Craig, S. J., Bayley, D., Christian, R. A., Geary, R., & Nicklin, P. L. (1997). Pharmacokinetics, metabolism, and elimination of a 20-mer phosphorothioate oligodeoxynucleotide (CGP 69846A) after intravenous and subcutaneous administration. *Biochemical Pharmacology*, *54*(6), 657–668.
- Potaczek, D. P., Garn, H., Unger, S. D., & Renz, H. (2016). Antisense molecules: A new class of drugs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *137*(5), 1334–1346. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1344>

- Prakash, T. P., Graham, M. J., Yu, J., Carty, R., Low, A., Chappell, A., ... Seth, P. P. (2014). Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Research*, 42(13), 8796–8807. <https://doi.org/10.1093/nar/gku531>
- Prakash, T. P., Mullick, A. E., Lee, R. G., Yu, J., Yeh, S. T., Low, A., ... Seth, P. P. (2019). Fatty acid conjugation enhances potency of antisense oligonucleotides in muscle. *Nucleic Acids Research*, 47(12), 6029–6044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz354>
- Raal, F. J., Santos, R. D., Blom, D. J., Marais, A. D., Charng, M.-J., Cromwell, W. C., ... Crooke, S. T. (2010). Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 375(9719), 998–1006. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60284-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60284-X)
- Rabinovitz, S., Kaufman, Y., Ludwig, G., Razin, A., & Shemer, R. (2012). Mechanisms of activation of the paternally expressed genes by the Prader-Willi imprinting center in the Prader-Willi/Angelman syndromes domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19), 7403–7408. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116661109>
- Ray, K. K., Landmesser, U., Leiter, L. A., Kallend, D., Dufour, R., Karakas, M., ... Kastelein, J. J. P. (2017). Inclisiran in patients at high cardiovascular risk with elevated LDL cholesterol. *New England Journal of Medicine*, 376(15), 1430–1440. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615758>
- Reilley, M. J., McCoon, P., Cook, C., Lyne, P., Kurzrock, R., Kim, Y., ... Hong, D. S. (2018). STAT3 antisense oligonucleotide AZD9150 in a subset of patients with heavily pretreated lymphoma: Results of a phase 1b trial. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 6(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0436-5>
- Renneberg, D., Bouliong, E., Reber, U., Schümperli, D., & Leumann, C. J. (2002). Antisense properties of tricyclo-DNA. *Nucleic Acids Research*, 30(13), 2751–2757. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf412>
- Ricotta, D. N., & Frishman, W. (2012). Mipomersen. *Cardiology in Review*, 20(2), 1–95. <https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e31823424be>
- Rinaldi, C., & Wood, M. J. A. (2017). Antisense oligonucleotides: The next frontier for treatment of neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 14(1), 9–21. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.148>
- Roehr, B. (1998). Fomivirsen approved for CMV retinitis. *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care*, 4(10), 14–16.
- Rosenberg, J. E., O'Donnell, P. H., Balar, A. V., McGregor, B. A., Heath, E. I., Yu, E. Y., ... Petrylak, D. P. (2019). Pivotal trial of Enfortumab Vedotin in urothelial carcinoma after platinum and anti-programmed death 1/programmed death ligand 1 therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 37, 2592–2600. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01140>
- Ross, J. S., Slodkowska, E. A., Symmans, W. F., Puztai, L., Ravdin, P. M., & Hortobagyi, G. N. (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: Ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The Oncologist*, 14(4), 320–368. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0230>
- Rowley, J. D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by Quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243(5405), 290–293. <https://doi.org/10.1038/243290a0>
- Rudin, C. M., Poirier, J. T., Byers, L. A., Dive, C., Dowlati, A., George, J., ... Gazdar, A. F. (2019). Molecular subtypes of small cell lung cancer: A synthesis of human and mouse model data. *Nature Reviews Cancer*, 19(5), 289–297. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0133-9>
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 203–222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Santos, R. D., Raal, F. J., Catapano, A. L., Witztum, J. L., Steinhagen-Thiessen, E., & Tsimikas, S. (2015). Mipomersen, an antisense oligonucleotide to apolipoprotein B-100, reduces lipoprotein(a) in various populations with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(3), 689–699. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304549>
- Sermet-Gaudelus, I., Clancy, J. P., Nichols, D. P., Nick, J. A., De Boeck, K., Solomon, G. M., ... Rowe, S. M. (2019). Antisense oligonucleotide eluforsen improves CFTR function in F508del cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 18(4), 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.10.015>
- Shen, L. X., Kandimalla, E. R., & Agrawal, S. (1998). Impact of mixed-backbone oligonucleotides on target binding affinity and target cleaving specificity and selectivity by *Escherichia coli* RNase H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6(10), 1695–1705. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(98\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(98)00131-X)
- Shen, W., De Hoyos, C. L., Migawa, M. T., Vickers, T. A., Sun, H., Low, A., ... Crooke, S. T. (2019). Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index. *Nature Biotechnology*, 37(6), 640–650. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0106-2>
- Shimojo, M., Paquette, A. J., Anderson, D. J., & Hersh, L. B. (1999). Protein kinase a regulates cholinergic gene expression in PC12 cells: REST4 silences the silencing activity of neuron-restrictive silencer factor/REST. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 6788–6795. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.10.6788>
- Shimojo, M., Kasahara, Y., Inoue, M., Tsunoda, S., Shudo, Y., Kurata, T., & Obika, S. (2019). A gapmer antisense oligonucleotide targeting SRRM4 is a novel therapeutic medicine for lung cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 7618. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43100-1>
- Sienkiewicz, D., Okurowska Zawada, B., Paszko Patej, G., Kawnik, K., & Kulak, W. (2015). Duchenne muscular dystrophy: Current cell therapies. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 8, 166–177. <https://doi.org/10.1177/1756285615586123>
- Skouldis, F., & Heymach, J. V. (2019). Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 19(9), 495–509. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0179-8>
- Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689), 1434–1437. <https://doi.org/10.1126/science.1102514>
- Steffens, R., & Leumann, C. J. (1997). Tricyclo-DNA: A phosphodiester-backbone based DNA analog exhibiting strong complementary base-pairing properties. *Journal of American Chemical Society*, 119, 11548–11549. <https://doi.org/10.1021/JA972597X>

- Stein, C. A., Subasinghe, C., Shinozuka, K., & Cohen, J. S. (1988). Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research*, *16*(8), 3209–3221.
- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., & Kauppinen, S. (2012). Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-3-1>
- Stephenson, M. L., & Zamecnik, P. C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(1), 285–288. <https://doi.org/10.1073/PNAS.75.1.285>
- Takakura, K., Kawamura, A., Torisu, Y., Koido, S., Yahagi, N., & Saruta, M. (2019). Clinical potential of oligonucleotide therapeutics against pancreatic cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 3331. <https://doi.org/10.20944/PREPRINTS201905.0239.V1>
- Tanowitz, M., Hettrick, L., Revenko, A., Kinberger, G. A., Prakash, T. P., & Seth, P. P. (2017). Asialoglycoprotein receptor 1 mediates productive uptake of N-Acetylgalactosamine-conjugated and unconjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides into liver hepatocytes. *Nucleic Acids Research*, *45*(21), 12388–12400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx960>
- Thompson, A. A., Walters, M. C., Kwiatkowski, J., Rasko, J. E. J., Ribeil, J.-A., Hongeng, S., ... Cavazzana, M. (2018). Gene therapy in patients with transfusion-dependent β -thalassemia. *New England Journal of Medicine*, *378*(16), 1479–1493. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705342>
- Tsimikas, S., Karwatowska-Prokopczuk, E., Gouni-Berthold, I., Tardif, J. C., Baum, S. J., Steinhagen-Thiessen, E., ... Witztum, J. L. (2020). Lipoprotein(a) reduction in persons with cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, *382*(3), 244–255. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1905239>
- Van Der Ree, M. H., Van Der Meer, A. J., Van Nuenen, A. C., De Bruijne, J., Ottosen, S., Janssen, H. L., ... Reesink, H. W. (2016). Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *43*(1), 102–113. <https://doi.org/10.1111/apt.13432>
- van Deutekom, J. C., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Frankhuizen, W. S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., ... van Ommen, G.-J. B. (2007). Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *New England Journal of Medicine*, *357*(26), 2677–2686. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073108>
- van Deutekom, J. C. T., Bremmer-Bout, M., Janson, A. A. M., Ginjaar, I. B., Baas, F., den Dunnen, J. T., & van Ommen, G.-J. B. (2001). Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Human Molecular Genetics*, *10*(15), 1547–1554. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.15.1547>
- Veedu, R. N., & Wengel, J. (2009). Locked nucleic acid as a novel class of therapeutic agents. *RNA Biology*, *6*(3), 321–323. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8807>
- Vitravene Study Group. (2002). A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsin for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *American Journal of Ophthalmology*, *133*(4), 467–474. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(02\)01327-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(02)01327-2)
- Wang, W.-T., Han, C., Sun, Y.-M., Chen, T.-Q., & Chen, Y.-Q. (2019). Noncoding RNAs in cancer therapy resistance and targeted drug development. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0748-z>
- Westbrook, T. F., Martin, E. S., Schlabach, M. R., Leng, Y., Liang, A. C., Feng, B., ... Elledge, S. J. (2005). A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell*, *121*(6), 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.033>
- Wheeler, T. M., Leger, A. J., Pandey, S. K., MacLeod, A. R., Nakamori, M., Cheng, S. H., ... Thornton, C. A. (2012). Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature*, *488*(7409), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature11362>
- Zhang, X., Wang, S., Wang, H., Cao, J., Huang, X., Chen, Z., ... Xu, Z. (2019). Circular RNA circNRIP1 acts as a microRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the AKT1/mTOR pathway. *Molecular Cancer*, *18*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0935-5>
- Zhang, Y., Ge, C., Zhu, C., & Salaita, K. (2014). DNA-based digital tension probes reveal integrin forces during early cell adhesion. *Nature Communications*, *5*(1), 5167. <https://doi.org/10.1038/ncomms6167>

How to cite this article: Quemener AM, Bachelot L, Forestier A, Donnou-Fournet E, Gilot D, Galibert M-D. The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside. *WIREs RNA*. 2020;11:e1594.<https://doi.org/10.1002/wrna.1594>

*Conclusion,
Discussion et
Perspectives*

Conclusion, discussion & perspectives

Contexte

Découverte d'une stratégie thérapeutique innovante pour le traitement du mélanome cutané métastatique

Le mélanome uvéal est un cancer de très mauvais pronostic dès lors qu'il atteint le stade métastatique. Malheureusement, la survenue de métastases est fréquente, elle représente environ 50 % des cas. Il est donc urgent et essentiel de trouver une nouvelle stratégie thérapeutique.

Le programme de recherche de l'équipe « Expression des gènes et oncogénèse » est dédié au décryptage des mécanismes moléculaires à l'origine du développement tumoral et de l'acquisition de mécanismes de résistance. Les projets menés dans le mélanome cutané ont conduit à l'identification d'un mécanisme original de pilotage de l'agressivité tumorale dans le mélanome cutané. L'équipe a montré que l'ARNm de *TYRPI*, connu pour son rôle dans la pigmentation, possédait une fonction non-codante. Cette fonction repose sur la capacité du 3'UTR de *TYRPI* de séquestrer, sur des motifs MRE-non canoniques, le miR-16. Ce miARN est un puissant suppresseur de tumeurs. L'identification de ce mécanisme repose sur une expérimentation de précipitation de l'ARN qui a mis en évidence l'interaction étroite entre le 3'UTR de *TYRPI* et le miR-16. Cette liaison non prédite par les logiciels classiques de prédiction s'explique par la fixation « non-canonique » du miR-16. Cette liaison n'entraîne pas la dégradation de *TYRPI* ni l'inhibition de sa traduction. Au contraire, elle tend à augmenter le niveau de *TYRPI*. Le miR-16 se trouve donc séquestré sur l'ARNm, ce qui a pour conséquence l'inhibition de son activité suppresseur de tumeurs. L'ARNm de *TYRPI* est très fortement exprimé dans les cellules de mélanome cutané. De ce fait, il peut monopoliser

une grande partie, sinon la totalité, du miR-16. De cette observation, une stratégie thérapeutique a pu être développée.

Des oligonucléotides anti-sens, les TSB, spécifiques des sites de liaison de miR-16 sur *TYRP1*, ont été conçus pour se lier à la place du miR-16 et, ainsi, restaurer son activité. Cette stratégie thérapeutique innovante a montré son efficacité *in vitro* pour réduire la prolifération cellulaire, ainsi qu'*in vivo* pour réduire le volume tumoral chez la souris.

Nous avons montré, dans la revue présentée en Résultats 2, que les oligonucléotides anti-sens sont devenus une stratégie thérapeutique émergente. Avec l'autorisation de mise sur le marché de plusieurs d'entre eux, ils ont prouvé leur innocuité et efficacité. Ces oligonucléotides étant à l'étude dans de plus en plus de pathologies, certains essais cliniques les ont mis à l'épreuve pour le traitement du cancer.

Pertinence de la stratégie TSB pour restaurer l'activité de miR-16 dans le mélanome uvéal

Malgré une origine commune, le mélanocyte, les mélanomes cutanés et uvéaux sont deux types de cancers différents par bien des aspects. Le premier est caractérisé par de fréquentes mutations de la voie des MAPK : *BRAF*, *NRAS* et *NF1*. Cette découverte a d'ailleurs permis de développer des inhibiteurs de cette voie qui, malgré des phénomènes de résistance, sont efficaces. L'immunothérapie est aussi utilisée comme traitement du mélanome cutané et montre, chez de nombreux patients, une très bonne réponse. À l'inverse, le mélanome uvéal ne présente pas les mêmes mutations, ce qui rend les thérapies ciblées précédemment citées inutilisables. L'immunothérapie a également donné des résultats décevants, n'ayant pas d'impact significatif sur la survie globale des patients.

Cependant, les cellules de mélanome uvéal et cutané, de par leur origine commune, partagent un certain nombre de caractéristiques, notamment une forte expression de *TYRP1* et de miR-16. De plus, miR-16 est connu pour être sous-exprimé dans plusieurs types de cancers, ce qui participe à la tumorigénèse. Cette sous-expression est due à une altération sur les deux chromosomes de l'un des loci qui codent

le miR-16. Environ 50 % des patients atteints de mélanome uvéal possèdent une altération chromosomique (monosomie du chromosome 3) susceptible d'impacter la quantité de miR-16. Nous avons montré que cette hypothèse n'est pas vraie dans ce cancer : malgré l'inexistence d'un des loci de production du miR-16, son expression demeure inchangée. Ces résultats confirment l'importance du miR-16 dans ce modèle et suggèrent un phénomène de compensation malgré une altération cytogénétique.

Dans ce modèle, le miR-16 ne paraît pas être pleinement actif suggérant un mécanisme d'inactivation par une potentielle séquestration. Pour autant, nos résultats initiaux ont montré que le miR-16 n'était pas séquestré par *TYRP1* comme dans le cas du mélanome cutané. Les TSB, dans leur design spécifique de *TYRP1*, n'étaient donc pas efficaces (données non présentées). C'est pourquoi nous avons voulu déterminer les ARNm responsables de la séquestration de miR-16 et ainsi pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

Les principaux résultats :

Identification des partenaires de miR-16 dans le mélanome uvéal

L'exemple du miR-16 sur *TYRP1* a mis en lumière des interactions miARN-ARNm ne conduisant pas à la dégradation de l'ARN. Une telle interaction est montrée dans de nombreuses études concernant les circARN. Ces ARN sont insensibles à l'activité des nucléases cellulaires de par leur conformation circulaire. Si la liaison du miARN sur l'ARNm de *TYRP1* n'entraîne pas la dégradation de ce dernier, ce n'est pas grâce à une conformation particulière comme cela a été décrit pour les circARN. Ceci est dû à la liaison du miARN sur des MRE non canoniques, c'est-à-dire n'impliquant pas ou que partiellement la région *seed* du miARN. Ainsi, ces découvertes montrent que l'activité d'un miARN ne se résume pas seulement à son expression ; elle dépend aussi de sa disponibilité.

Pour estimer l'activité d'un miARN, il faut donc considérer son expression, ainsi que celle de l'ensemble de ses partenaires. Les partenaires d'un miARN peuvent être multiples et ils définissent un véritable réseau. Les réseaux de miARN ont été mis en évidence, notamment par l'équipe de Pier Paolo Pandolfi définissant la notion de

ceARN (*Competing Endogenous RNA*). Cette notion de compétition entre les cibles d'un miARN met en avant l'existence de réseaux d'interaction entre le miARN et ses cibles, et plus largement ses partenaires. L'expression respective de ces partenaires est cruciale pour déterminer l'activité du miARN. En effet, plus un partenaire est exprimé, plus il aura une capacité potentielle à monopoliser le miARN et à le détourner de ses autres partenaires. Ce n'est évidemment pas le seul critère. Tous les partenaires d'un miARN n'ont pas la même affinité, il est donc aussi important de prendre en considération les séquences d'hybridation qui définissent le type de MRE. Ces réseaux, déjà décrits, ne contiennent pour la plupart que les ARN dont l'expression diminue en réponse au miR-16.

Pour comprendre l'activité du miR-16 dans le mélanome uvéal, nous avons donc décidé d'identifier tous les partenaires du miR-16. Par analogie à la séquestration de miR-16 sur *TYRPI*, nous avons choisi de nous concentrer sur les ARNm. Pour cela, nous avons sélectionné deux technologies complémentaires et non supervisées : une analyse transcriptomique en cinétique pour évaluer l'effet de la surexpression de miR-16 et une précipitation des partenaires de miR-16 par une hybridation *in cellulo* au miR-16 biotinylé. Nous avons analysé simultanément ces deux expériences car elles apportent des résultats très complémentaires. Alors que la cinétique nous renseigne sur les ARN dont l'expression est la plus affectée par le miR-16, la précipitation nous permet d'identifier seulement les partenaires directs. De façon intéressante, nous avons identifié bon nombre d'ARN dont l'expression était augmentée au cours de la cinétique. Cette observation avait déjà été faite avec *TYRPI*. Nous avons donc décidé de séparer nos partenaires en deux catégories distinctes : ceux dont l'expression était augmentée et ceux dont l'expression était réduite. Ces deux populations d'ARN constituent l'interactome de miR-16.

[Identification de nouveaux partenaires de miR-16 dans le mélanome uvéal](#)

Nous avons obtenu, d'une part, une liste de partenaires directs dont l'expression est réduite de manière miR-16 dépendante. Il s'agit donc bien de cibles de miR-16. Nous les avons validés dans différentes lignées de mélanome uvéal, mais aussi dans un

autre cancer, à savoir le carcinome colorectal (lignée HCT116). Ce mécanisme est relativement bien conservé entre les différents modèles. En effet, nous validons quelques candidats comme la *CCND1*, *CCND3* ou *WEE1* qui sont connus pour être des cibles de miR-16 dans de nombreux modèles : ostéosarcome, lymphome ou encore le carcinome pulmonaire (Cai et al., 2012 ; Chen et al., 2008). Ce mécanisme conservé fait intervenir la région *seed* des miARN et définit un MRE canonique. Il est donc possible de les prédire par méthode bio-informatique. Nous avons alors utilisé des outils en ligne pour valider ce point. Nous avons ainsi déterminé une liste de cibles validées dans le mélanome et dont la régulation réduit la prolifération cellulaire, comme c'est le cas par la surexpression de miR-16. De ce fait, miR-16 semble exercer son activité notamment par la sous-expression de cibles telles que *AMOT*, *TACCI*, *DNAJB4* et *NRBP1*.

D'autre part, nous avons identifié une liste de gènes dont l'expression est augmentée en réponse au miR-16. Cette liste est plus étonnante car les miARN sont très peu décrits pour avoir une activité relative à une augmentation d'expression. Nous en avons déjà l'exemple avec *TYRP1* dont la séquestration de miR-16 tendait à augmenter l'expression transcriptomique et protéique. D'autres exemples dans la littérature font état également d'augmentation de l'expression de transcrits en réponse à un miARN. C'est le cas notamment de la protéine FXR1 qui a été montrée comme augmentant la traduction par liaison du miARN sur sa cible, dépendant des phases du cycle cellulaire. Très récemment, une étude a décrit le mécanisme de façon plus précise. FXR1 entrainerait une circularisation de l'ARNm pour favoriser la traduction (doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.19.210252>).

Nous nous sommes intéressés au potentiel éponge de certains de ces candidats pour expliquer l'inactivité totale ou partielle du miR-16 dans ce modèle. Nous avons identifié *PYGB* comme étant une éponge efficace du miR-16 dans le mélanome uvéal. Il fait partie des plus exprimés au niveau basal, ce qui est primordial pour titrer une partie considérable des molécules de miR-16. Nous avons également identifié des MRE non canoniques, validés par des expériences de gènes rapporteurs (luciférase). De plus, la diminution d'expression basale de *PYGB* par shARN diminue l'expression des cibles

de miR-16 identifiées, ce qui valide la libération du miR-16 par dégradation de son éponge.

Relevance clinique de l'étude des partenaires de miR-16

Ces deux listes de gènes, qui regroupent les cibles d'un côté et les partenaires sur-exprimés de l'autre, ont une relevance biologique. Reflet direct de l'activité du miR-16, elles classent les patients et montrent une corrélation directe entre le statut du chromosome 3 et le pronostic de survie des patients. Le lien entre l'activité du miR-16 et le statut du chromosome 3 n'est pas établi. Bien que le miR-16 soit codé par le chromosome 3, les patients atteints d'une monosomie 3 n'ont pas une plus faible expression de miR-16. Ainsi, la différence d'expression ne peut pas expliquer que les patients aient des partenaires de miR-16 fortement exprimés et que les cibles de miR-16 soient elles aussi surexprimées. Le pronostic est donc bel et bien relié à l'activité de miR-16 et non à son niveau d'expression. Sachant que le pronostic des patients de mélanomes uvéaux est aussi corrélé au statut du chromosome 3, il serait intéressant de voir si un acteur de ce mécanisme ne serait pas codé par le chromosome 3. En conséquence, la monosomie affecterait son niveau d'expression, et ainsi perturberait l'activité du miR-16.

Pour aller plus loin

Optimisation de l'identification de la séquence des MRE-16

L'étape suivante de ce projet serait d'identifier de façon non supervisée les séquences d'interaction exactes entre miR-16 et les ARN. Cela compléterait les prédictions bio-informatiques partielles. Dans cette étude, nous avons mis en évidence les candidats ARNm de façon exhaustive et non supervisée. Concernant la séquence du MRE, nous nous sommes servis de l'outil en ligne RNAhybrid qui prédit les interactions entre deux séquences ARN par calcul de l'énergie de liaison nécessaire. Cet outil est puissant lorsqu'on possède l'identité de l'éventuel partenaire, car la recherche s'effectue grâce à l'entrée de la séquence des deux ARN (le miARN et le potentiel partenaire). Un autre outil peut être utilisé pour prédire les MRE non canoniques. Il s'agit de

STarMirDB. Cet outil prédit les interactions entre un miARN et des ARNm. Il est possible de tester plusieurs candidats simultanément. De plus, cet outil prédit à la fois des MRE qui impliquent la *seed* dans le 3'UTR, 5'UTR et dans la région codante. Il peut, en partie, répondre à notre problématique, car il a la capacité de prédire des liaisons ne faisant pas intervenir la région *seed* et donc des MRE non canoniques (Rennie et al., 2016). Nous ne l'avons pas utilisé car, malheureusement, les prédictions semblaient moins pertinentes qu'avec RNAhybrid. Cela vient notamment du fait qu'il distingue les sites canoniques, faisant intervenir la région *seed*, des sites ne faisant pas du tout intervenir la *seed*. Nous avons découvert en analysant *PYGB* que les MRE non canoniques peuvent faire intervenir la région *seed* mais partiellement. En effet, en prenant *PYGB* comme exemple, seuls deux sites d'interactions sont prédits par cet outil contre une dizaine pour RNAhybrid, avec une énergie de liaison inférieure à -15 kcal/mol. L'idéal serait donc de développer un logiciel pouvant faire les mêmes prédictions que RNAhybrid, mais sur un ensemble de gènes, voire même sur le transcriptome. Des outils se développent pour prédire les cibles d'un miARN, plus seulement en utilisant la complémentarité de séquences au niveau de la *seed*, mais en alliant des paramètres thermodynamiques et des modèles mathématiques. Cela rendra à l'avenir l'étude des MRE non canoniques plus facile et plus automatique.

Une méthode expérimentale pourrait également permettre d'identifier les sites d'interaction entre un miARN et un ARN. Il s'agit de réaliser une précipitation en utilisant les miARN biotinylés, comme cela a été fait dans l'article présenté dans la partie Résultats 1. Il faut ajouter, avant le séquençage, une étape de digestion par une RNase T1 qui a pour rôle de dégrader toutes les régions simple brin. Ensuite, il est possible de séquencer par RNAseq le produit obtenu. Cette technique, mise au point par l'équipe de Judy Liebermann pour identifier les partenaires du miR-522, a montré une spécificité très importante. Seulement 0,7 % des *reads* ne correspondaient pas au miR-522. De façon intéressante, les résultats obtenus montrent que, dans ce modèle, la grande majorité des sites de liaison ne suivent pas les règles d'appariement ; ce qui est en adéquation avec nos résultats montrant l'existence de MRE non canoniques (Tan & Lieberman, 2016).

Nous avons utilisé les premières étapes du protocole de cette équipe pour réaliser notre précipitation ; il est donc possible de réaliser cette étape supplémentaire en ayant déjà optimisé, pour notre modèle, les premières étapes.

Identification des autres partenaires de miR-16

Étant donné que les miARN se fixent par complémentarité de séquences, ils peuvent avoir pour partenaires d'autres catégories d'ARN. Comme présenté précédemment, les circARN sont décrits pour avoir de nombreux MRE canoniques et être des éponges à miARN efficaces. Mais ils ne sont pas les seuls ARN non codants pouvant lier des miARN. Au même titre, les ARNlnc peuvent aussi lier des miARN. Concernant les ARN lnc, l'étude se rapproche de notre démarche avec *PYGB* et *TYRPI*. En effet, ils ne bénéficient pas de la conformation circulaire pouvant les protéger de la dégradation par les nucléases. De ce fait, il faut distinguer les MRE canoniques des MRE non canoniques pour évaluer l'effet de la liaison du miARN. Il serait donc intéressant pour connaître de façon exhaustive les partenaires de miR-16, de quantifier également les ARN lnc et les circARN. Pour ce faire, il faudrait, suite à une précipitation des ARN liés aux miR-16 synthétiques, réaliser un séquençage spécifique des ARN lnc.

Y a-t-il des partenaires protéiques ?

Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire sous-jacent, il serait intéressant d'analyser les partenaires protéiques. Ago est-il impliqué dans ce mécanisme malgré l'absence de baisse d'expression ? D'autres candidats sont aussi à considérer comme *FXR1*, présenté en introduction, qui aurait une influence sur la traduction. Pour mener cette étude de façon exhaustive, nous pourrions combiner plusieurs méthodes. Dans un premier temps, afin de voir les protéines partenaires de ce mécanisme, il est possible d'utiliser une construction artificielle composée du 3'UTR du gène d'intérêt fusionné avec des motifs tige-boucle MS2. En co-transfectant un plasmide codant la protéine MS2 couplée à la GFP, il est possible d'immuno-précipiter le complexe avec un anticorps anti-GFP. Cette expérience suivie d'une analyse par

spectrométrie de masse permettrait d'identifier les protéines associées aux ARN dans ce mécanisme. Cette approche permet de cibler les protéines associées à un 3'UTR donné et donc de sélectionner une région où seul le miR-16 peut se fixer sur un MRE non canonique. Il serait également possible de réaliser la même immuno-précipitation en adaptant le protocole afin de purifier les protéines associées. Ensuite, les protéines ainsi précipitées pourraient être analysées également par spectrométrie de masse.

Cette technique a l'avantage de ne pas sur-exprimer de 3'UTR et donc de pouvoir identifier les protéines associées au miARN, quel que soit son site de fixation. On retrouverait aussi les protéines du RISC telles qu'Ago2. Cette expérience est en cours de mise au point et nécessite d'être adaptée et répétée. Une fois les candidats identifiés, des étapes de validation pourront être faites, notamment des immuno-précipitations de la/des protéine(s) précédemment identifiée(s) pour valider sa/leur liaison au miR-16, ainsi qu'aux ARN cibles. Il est également possible de valider ces interactions ARN-protéines *in vitro* grâce à des expériences de retard sur gel en utilisant des protéines purifiées.

Existe-t-il d'autres mécanismes d'éponge dans la cellule ?

L'équipe a identifié précédemment un mécanisme original de séquestration du miR-16 sur *TYRPI*, puis sur *PYGB* durant ma thèse. Il est fort probable que des mécanismes de séquestration existent pour de nombreux miARN, voire pour tous. Une meilleure compréhension de ce mécanisme moléculaire rendrait plus aisées les études sur l'ensemble des miARN. En effet, les techniques précédemment énoncées, comme l'immuno-précipitation des candidats protéiques impliqués dans ce processus, permettent d'identifier les autres miARN.

Mécanisme conservé ou cellules spécifiques ?

Initialement, ce projet de thèse devait consister en une validation du mécanisme de séquestration du miR-16 sur *TYRPI* dans un autre modèle, le mélanome uvéal, car ce cancer ne dispose pas de traitement efficace au stade métastatique. Nous nous sommes aperçus que cette séquestration était bien présente dans ce modèle, mais pas

sur le même ARN. Il y a donc une certaine spécificité cellulaire dans ce phénomène de séquestration. Ceci a également été montré lorsque nous avons voulu valider aussi bien nos cibles que nos partenaires surexprimés dans les cellules HCT116 (cancer du côlon). En effet, le mécanisme de répression transcriptomique par les miARN semble bien conservé, la quasi-totalité de nos cibles testées ont été validées dans d'autres modèles, dont le mélanome cutané (données non publiées). Mais concernant la séquestration, il est plus difficile d'établir une règle générale. Pour commencer, comme présenté précédemment, *TYRPI* n'est pas une éponge à miR-16 dans le mélanome uvéal. De plus, nous avons voulu valider la surexpression des partenaires de miR-16 dans d'autres modèles, comme les HCT116 (données dans l'article présenté dans la partie Résultats 1), et dans un modèle de mélanome cutané (données non publiées) ; or tous les candidats ne sont pas validés. Il semblerait que ce mécanisme soit dépendant du modèle. Ceci peut s'expliquer par le fait que le transcriptome d'une cellule à l'autre est bien différent. L'expression de chacun des ARN qui le composent est soumise à de fines régulations. En effet, éponge comme cible d'un miARN peuvent aussi être éponge ou cible d'un autre miARN. Il faut, en outre, considérer les différences de stabilité, ainsi que de demi-vie et également la différence d'expression basale.

Conclusion générale

À travers ces travaux, nous avons montré l'importance d'étudier l'activité des miARN indépendamment de leur expression. Nous avons également confirmé que des liaisons non canoniques des miARN sur les ARNm ont une importance fonctionnelle majeure. En effet, ces liaisons peuvent entraîner une augmentation d'expression de leurs partenaires. Ceci participe à la baisse d'activité des miARN en entrant en compétition avec les cibles classiques. Nous avons observé une augmentation à la fois transcriptionnelle et protéique de ces partenaires. Pour mieux caractériser le mécanisme moléculaire sous-jacent nous nous intéressons aux éventuelles protéines qui interagissent dans ce mécanisme. Cette étude a également permis de mettre en évidence que l'activité du miR-16 peut prédire la survie des patients dans le mélanome uvéal, ce qui confirme l'importance de l'étude de l'activité des miARN. La remise en activité d'un miARN ayant une activité suppresseur de tumeur en le détournant des ARN sur

lequel il est séquestré peut remettre de restaurer son activité par la dégradation de ces cibles.

Il s'agit cependant d'une étude focalisée sur un seul miARN. Chaque miARN est le centre de tout un réseau de partenaires. Le transcriptome est composé de tous ces réseaux interdépendants. La moindre dérégulation a des conséquences sur l'ensemble du réseau et non uniquement sur un seul candidat. Il est donc important lors de l'étude des miARN, d'étudier tous les partenaires directs pour pouvoir mesurer les conséquences transcritomiques de la dérégulation d'un miARN.

Bibliographie

Bibliographie

- Aalto, Y., Eriksson, L., Seregard, S., Larsson, O., & Knuutila, S. (2001). Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *42*(2), 313–317.
- Abdel-Rahman, M. H., Pilarski, R., Cebulla, C. M., Massengill, J. B., Christopher, B. N., Boru, G., ... Davidorf, F. H. (2011). Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *Journal of Medical Genetics*, *48*(12), 856–859. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100156>
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife*, *4*(AUGUST2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Akbani, R., Akdemir, K. C., Aksoy, B. A., Albert, M., Ally, A., Amin, S. B., ... Zou, L. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, *161*(7), 1681–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
- Algazi, A. P., Tsai, K. K., Shoushtari, A. N., Munhoz, R. R., Eroglu, Z., Piulats, J. M., ... Sullivan, R. J. (2016). Clinical outcomes in metastatic uveal melanoma treated with PD-1 and PD-L1 antibodies. *Cancer*, *122*(21), 3344–3353. <https://doi.org/10.1002/cncr.30258>
- Alsafadi, S., Houy, A., Battistella, A., Popova, T., Wassef, M., Henry, E., ... Stern, M. H. (2016). Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10615>
- Amaro, A., Gangemi, R., Piaggio, F., Angelini, G., Barisione, G., Ferrini, S., & Pfeffer, U. (2017). The biology of uveal melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*, *36*(1), 109–140. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9663-3>
- Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*, *57*(1), 49–57. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90171-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90171-2)
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., ... Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, *9*(3), 277–279. <https://doi.org/10.1261/rna.2183803>
- Aoude, L. G., Vajdic, C. M., Krickler, A., Armstrong, B., & Hayward, N. K. (2013). Prevalence of germline *BAP1* mutation in a population-based sample of uveal melanoma cases. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *26*(2), 278–279. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12046>
- Aronow, M. E., Topham, A. K., & Singh, A. D. (2018). Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973-2013). *Ocular Oncology and Pathology*, *4*(3), 145–151. <https://doi.org/10.1159/000480640>
- Arvey, A., Larsson, E., Sander, C., Leslie, C. S., & Marks, D. S. (2010). Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. *Molecular Systems Biology*, *6*, 363. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.24>
- Aughton, K., Kalirai, H., & Coupland, S. E. (2020, August 6). MicroRNAs and Uveal Melanoma: Understanding the Diverse Role of These Small Molecular Regulators. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21165648>
- B. Dréno, A. Ribas, J. Larkin, P.A. Ascierto, A. Hauschild, L. Thomas, ... G.A. McArthur. (2017). *Incidence, course, and management of toxicities associated with cobimetinib in combination with vemurafenib in the coBRIM study - Annals of Oncology*. 1137–1144.

Retrieved from [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)32016-2/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)32016-2/fulltext)

- Babchia, N., Calipel, A., Mouriaux, F., Faussat, A. M., & Mascarelli, F. (2010). The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K signaling pathways in human uveal melanoma cells: Interaction with B-Raf/ERK. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *51*(1), 421–429. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3974>
- Baccarini, A., Chauhan, H., Gardner, T. J., Jayaprakash, A. D., Sachidanandam, R., & Brown, B. D. (2011). Kinetic analysis reveals the fate of a MicroRNA following target regulation in mammalian cells. *Current Biology*, *21*(5), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.067>
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, *455*(7209), 64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
- Bajan, S., & Hutvagner, G. (2020). RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, *9*(1), 137. <https://doi.org/10.3390/cells9010137>
- Balani, K., Brito, F. C., Kos, L., & Agarwal, A. (2009). Melanocyte pigmentation stiffens murine cardiac tricuspid valve leaflet. *Journal of The Royal Society Interface*, *6*(40), 1097–1102. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0174>
- Ballarino, M., Pagano, F., Girardi, E., Morlando, M., Cacchiarelli, D., Marchioni, M., ... Bozzoni, I. (2009). Coupled RNA Processing and Transcription of Intergenic Primary MicroRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(20), 5632–5638. <https://doi.org/10.1128/mcb.00664-09>
- Baronti, L., Guzzetti, I., Ebrahimi, P., Friebe Sandoz, S., Steiner, E., Schlagnitweit, J., ... Petzold, K. (2020). Base-pair conformational switch modulates miR-34a targeting of Sirt1 mRNA. *Nature*, *583*(7814), 139–144. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2336-3>
- Barrenäs, M. L., & Lindgren, F. (1990). The influence of inner ear melanin on susceptibility to tss in humans. *Scandinavian Audiology*, *19*(2), 97–102. <https://doi.org/10.3109/01050399009070759>
- Bartel, D. P. (2004, January 23). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, Vol. 116, pp. 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bartel, D. P. (2009, January 23). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, Vol. 136, pp. 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bartel, D. P. (2018, March 22). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, Vol. 173, pp. 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Baskerville, S., & Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, *11*(3), 241–247. <https://doi.org/10.1261/rna.7240905>
- Bedikian, A. Y., Legha, S. S., Mavligit, G., Carrasco, C. H., Khorana, S., Plager, C., ... Benjamin, R. S. (1995). Treatment of uveal melanoma metastatic to the liver. A review of the M. D. Anderson cancer center experience and prognostic factors. *Cancer*, *76*(9), 1665–1670. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19951101\)76:9<1665::AID-CNCR2820760925>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19951101)76:9<1665::AID-CNCR2820760925>3.0.CO;2-J)
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., & Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes and Development*, *20*(14), 1885–1898. <https://doi.org/10.1101/gad.1424106>
- Berezikov, E. (2011, December 18). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 12, pp. 846–860. <https://doi.org/10.1038/nrg3079>
- Bobbin, M. L., & Rossi, J. J. (2016). RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *56*(1), 103–122. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103633>
- Bofill-De Ros, X., Kasprzak, W. K., Bhandari, Y., Fan, L., Cavanaugh, Q., Jiang, M., ... Gu,

- S. (2019). Structural Differences between Pri-miRNA Paralogs Promote Alternative Drosha Cleavage and Expand Target Repertoires. *Cell Reports*, 26(2), 447-459.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.054>
- Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., & Hirth, P. (2012, November 12). Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 11, pp. 873–886. <https://doi.org/10.1038/nrd3847>
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(12), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
- Bosson, A. D., Zamudio, J. R., & Sharp, P. A. (2014). Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Molecular Cell*, 56(3), 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.018>
- Bott, A., Erdem, N., Lerrer, S., Hotz-Wagenblatt, A., Breunig, C., Abnaof, K., ... Wiemann, S. (2017). miRNA-1246 induces pro-inflammatory responses in mesenchymal stem/stromal cells by regulating PKA and PP2A. *Oncotarget*, 8(27), 43897–43914. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14915>
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*, 3(3), 0404–0418. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085>
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008, May). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 84, pp. 539–549. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x>
- Buder, K., Gesierich, A., Gelbrich, G., & Goebeler, M. (2013). Systemic treatment of metastatic uveal melanoma: Review of literature and future perspectives. *Cancer Medicine*, Vol. 2, pp. 674–686. <https://doi.org/10.1002/cam4.133>
- Cai, C. K., Zhao, G. Y., Tian, L. Y., Liu, L., Yan, K., Ma, Y. L., ... Ma, B. A. (2012). miR-15a and miR-16-1 downregulate CCND1 and induce apoptosis and cell cycle arrest in osteosarcoma. *Oncology Reports*, 28(5), 1764–1770. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1995>
- Calin, G. A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Shimizu, M., ... Croce, C. M. (2008). MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), 5166–5171. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800121105>
- Calin, George Adrian, Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., ... Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Carbone, M., Ferris, L. K., Baumann, F., Napolitano, A., Lum, C. A., Flores, E. G., ... Yang, H. (2012). BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 179. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-179>
- Cardin, S. E., & Borchert, G. M. (2017). Viral microRNAs, host microRNAs regulating viruses, and bacterial microRNA-like RNAs. *Methods in Molecular Biology*, 1617, 39–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7046-9_3
- Cassoux, N., Rodrigues, M. J., Plancher, C., Asselain, B., Levy-Gabriel, C., Lumbroso-Le Rouic, L., ... Couturier, J. (2014). Genome-wide profiling is a clinically relevant and affordable prognostic test in posterior uveal melanoma. *British Journal of Ophthalmology*, 98(6), 769–774. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-303867>
- Chang, T. C., Yu, D., Lee, Y. S., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., ... Mendell, J. T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics*, 40(1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.30>
- Chatterjee, S., Fasler, M., Büssing, I., & Großhans, H. (2011). Target-Mediated Protection of Endogenous MicroRNAs in *C. elegans*. *Developmental Cell*, 20(3), 388–396.

- <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.02.008>
- Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W., & Hannon, G. J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, *465*(7298), 584–589. <https://doi.org/10.1038/nature09092>
- Chen, C. Y. A., & Shyu, A. Bin. (2011, March). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, Vol. 2, pp. 167–183. <https://doi.org/10.1002/wrna.40>
- Chen, R. W., Bemis, L. T., Amato, C. M., Myint, H., Tran, H., Birks, D. K., ... Robinson, W. A. (2008). Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma. *Blood*, *112*(3), 822–829. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-142182>
- Chen, W., Wang, H., Chen, H., Liu, S., Lu, H., Kong, D., ... Lu, Z. (2014). Clinical significance and detection of microRNA-21 in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma in Chinese population. *European Journal of Haematology*, *92*(5), 407–412. <https://doi.org/10.1111/ejh.12263>
- Chi, S. W., Zang, J. B., Mele, A., & Darnell, R. B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, *460*(7254), 479–486. <https://doi.org/10.1038/nature08170>
- Chiang, H. R., Schoenfeld, L. W., Ruby, J. G., Auyeung, V. C., Spies, N., Baek, D., ... Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & Development*, *24*(10), 992–1009. <https://doi.org/10.1101/gad.1884710>
- Chien, J. L., Sioufi, K., Surakiatchanukul, T., Shields, J. A., & Shields, C. L. (2017, May 1). Choroidal nevus: A review of prevalence, features, genetics, risks, and outcomes. *Current Opinion in Ophthalmology*, Vol. 28, pp. 228–237. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000361>
- Chu, C. Y., & Rana, T. M. (2006). Translation repression in human cells by MicroRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biology*, *4*(7), 1122–1136. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040210>
- Church, V. A., Pressman, S., Isaji, M., Truscott, M., Cizmecioglu, N. T., Buratowski, S., ... Carthew, R. W. (2017). Microprocessor Recruitment to Elongating RNA Polymerase II Is Required for Differential Expression of MicroRNAs. *Cell Reports*, *20*(13), 3123–3134. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.010>
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., & Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, *30*(1), 30–41. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., ... Giraldez, A. J. (2010). A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires argonaute2 catalytic activity. *Science*, *328*(5986), 1694–1698. <https://doi.org/10.1126/science.1190809>
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., ... Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(39), 13944–13949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>
- Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S. R., Bowman, A., Brown, J. W. S., ... Hutvagner, G. (2009). Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA*, *15*(12), 2147–2160. <https://doi.org/10.1261/rna.1738409>
- Creuzet, S. E., & Etchevers, H. C. (2017). Embryologie de l'œil. In D. Denis, E. Qui Buoc, & A. Aziz Alessi (Eds.), *Ophthalmologie pédiatrique: Rapport SFO 2017* (pp. 739–756. doi:10.6084/m9.figshare.4983362.v1). <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4983362.v1>
- Cui, J. (2015). MiR-16 family as potential diagnostic biomarkers for cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(2), 1703–1714.

- Cui, M., Wang, H., Yao, X., Zhang, D., Xie, Y., Cui, R., & Zhang, X. (2019). Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Frontiers in Genetics*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00626>
- D'Mello, S. A. N., Finlay, G. J., Baguley, B. C., & Askarian-Amiri, M. E. (2016, July 15). Signaling pathways in melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17071144>
- D Q Wu, C H Lee, S G Rhee, & M I Simon. (1992). *Activation of Phospholipase C by the Alpha Subunits of the Gq and G11 Proteins in Transfected Cos-7 Cells - PubMed*. 1811–1817. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1309799/>
- Das, S., Ferlito, M., Kent, O. A., Fox-Talbot, K., Wang, R., Liu, D., ... Steenberg, C. (2012). Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circulation Research*, *110*(12), 1596–1603. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.267732>
- Daugaard, I., & Hansen, T. B. (2017, March 1). Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs. *Trends in Genetics*, Vol. 33, pp. 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.01.003>
- Davis, B. N., Hilyard, A. C., Nguyen, P. H., Lagna, G., & Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote MicroRNA maturation by Drosha. *Molecular Cell*, *39*(3), 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.011>
- Decatur, C. L., Ong, E., Garg, N., Anbunathan, H., Bowcock, A. M., Field, M. G., & Harbour, J. W. (2016). Driver mutations in uveal melanoma associations with gene expression profile and patient outcomes. *JAMA Ophthalmology*, *134*(7), 728–733. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.0903>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, *432*(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Denzler, R., McGeary, S. E., Title, A. C., Agarwal, V., Bartel, D. P., & Stoffel, M. (2016). Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression. *Molecular Cell*, *64*(3), 565–579. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.027>
- Denzler, R., & Stoffel, M. (2015, October 1). The Long, the Short, and the Unstructured: A Unifying Model of miRNA Biogenesis. *Molecular Cell*, Vol. 60, pp. 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.014>
- Di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *9*(1), 287–314. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104715>
- Ding, S., Wu, X., Li, G., Han, M., Zhuang, Y., & Xu, T. (2005). Efficient Transposition of the piggyBac (PB) Transposon in Mammalian Cells and Mice. *Cell*, *122*(3), 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.013>
- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, *489*(7414), 101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
- Doench, J. G., & Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes and Development*, *18*(5), 504–511. <https://doi.org/10.1101/gad.1184404>
- Donzelli, S., Mori, F., Bellissimo, T., Sacconi, A., Casini, B., Frixia, T., ... Blandino, G. (2015). Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis. *Oncotarget*, *6*(34), 35183–35201. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5930>
- Dragomir, M. P., Knutsen, E., & Calin, G. A. (2018, August 9). SnapShot: Unconventional miRNA Functions. *Cell*, Vol. 174, pp. 1038–1038.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.040>
- Dubey, S., & Roulin, A. (2014). Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins. *Pigment Cell and Melanoma Research*, *27*(3), 327–338. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12231>
- Durante, M. A., Rodriguez, D. A., Kurtenbach, S., Kuznetsov, J. N., Sanchez, M. I., Decatur,

- C. L., ... Harbour, J. W. (2020). Single-cell analysis reveals new evolutionary complexity in uveal melanoma. *Nature Communications*, *11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14256-1>
- Ebert, M. S., Neilson, J. R., & Sharp, P. A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature Methods*, *4*(9), 721–726. <https://doi.org/10.1038/nmeth1079>
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2010, November). MicroRNA sponges: Progress and possibilities. *RNA*, Vol. 16, pp. 2043–2050. <https://doi.org/10.1261/rna.2414110>
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2012, April 27). Roles for MicroRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, Vol. 149, pp. 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.005>
- Ehret, C. F., & De Haller, G. (1963). Origin, development, and maturation of organelles and organelle systems of the cell surface in *Paramecium*. *Journal of Ultrastructure Research*, *9*(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(63\)80088-x](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(63)80088-x)
- Eiring, A. M., Harb, J. G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J. J., Spizzo, R., ... Perrotti, D. (2010). miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts. *Cell*, *140*(5), 652–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.007>
- Elbarbary, R. A., Miyoshi, K., Myers, J. R., Du, P., Ashton, J. M., Tian, B., & Maquat, L. E. (2017). Tudor-SN-mediated endonucleolytic decay of human cell microRNAs promotes G1/S phase transition. *Science*, *356*(6340), 859–862. <https://doi.org/10.1126/science.aai9372>
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, *411*(6836), 494–498. <https://doi.org/10.1038/35078107>
- Eletr, Z. M., & Wilkinson, K. D. (2011). An Emerging Model for BAP1's Role in Regulating Cell Cycle Progression. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *60*(1–2), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9184-6>
- Ender, C., Krek, A., Friedländer, M. R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., ... Meister, G. (2008). A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Molecular Cell*, *32*(4), 519–528. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.017>
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., & Croce, C. M. (2013). A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors. *RNA Biology*, *10*(2), 169–174. <https://doi.org/10.4161/rna.23144>
- Fang, W., & Bartel, D. P. (2015). The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes. *Molecular Cell*, *60*(1), 131–145. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.015>
- Fang, W., & Bartel, D. P. (2020). MicroRNA Clustering Assists Processing of Suboptimal MicroRNA Hairpins through the Action of the ERH Protein. *Molecular Cell*, *78*(2), 289–302.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.026>
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C., & Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis. *Cell*, *123*(5), 819–831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.023>
- Feingold, E. A., Good, P. J., Guyer, M. S., Kamholz, S., Liefer, L., Wetterstrand, K., ... Harvey, S. C. (2004, October 22). The ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) Project. *Science*, Vol. 306, pp. 636–640. <https://doi.org/10.1126/science.1105136>
- Felden, B., & Gilot, D. (2019, January 1). Modulation of bacterial sRNAs activity by epigenetic modifications: Inputs from the eukaryotic miRNAs. *Genes*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3390/genes10010022>
- Feng, X., Degese, M. S., Iglesias-Bartolome, R., Vaque, J. P., Molinolo, A. A., Rodrigues, M., ... Gutkind, J. S. (2014). Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal

- melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell*, 25(6), 831–845. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.016>
- Field, M. G., Durante, M. A., Anbunathan, H., Cai, L. Z., Decatur, C. L., Bowcock, A. M., ... Harbour, J. W. (2018). Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02428-w>
- Field, M. G., & Harbour, J. W. (2014, June 16). GNAQ/11 mutations in uveal melanoma: Is YAP the key to targeted therapy? *Cancer Cell*, Vol. 25, pp. 714–715. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.028>
- Field, M. G., Kuznetsov, J. N., Bussies, P. L., Cai, L. Z., Alawa, K. A., Decatur, C. L., ... Harbour, J. W. (2019). BAP1 loss is associated with DNA methylomic repatterning in highly aggressive class 2 uveal melanomas. *Clinical Cancer Research*, 25(18), 5663–5673. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0366>
- Finoux, A. L., & Chartrand, P. (2008). Oncogenic and tumour suppressor microRNAs. *Medecine/Sciences*, Vol. 24, pp. 1049–1054. <https://doi.org/10.1051/medsci/200824121049>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Flynt, A. S., Greimann, J. C., Chung, W. J., Lima, C. D., & Lai, E. C. (2010). MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 38(6), 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.014>
- Forsberg, E. M. V., Lindberg, M. F., Jespersen, H., Alsen, S., Bagge, R. O., Donia, M., ... Nilsson, J. A. (2019). HER2 CAR-T cells eradicate uveal melanoma and T-cell therapy-resistant human melanoma in IL2 transgenic NOD/SCID IL2 receptor knockout mice. *Cancer Research*, 79(5), 899–904. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3158>
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., ... Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, 39(8), 1033–1037. <https://doi.org/10.1038/ng2079>
- Frank, F., Sonenberg, N., & Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, 465(7299), 818–822. <https://doi.org/10.1038/nature09039>
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Fromm, B., Billipp, T., Peck, L. E., Johansen, M., Tarver, J. E., King, B. L., ... Peterson, K. J. (2015). A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome. *Annual Review of Genetics*, 49(1), 213–242. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092023>
- Furney, S. J., Pedersen, M., Gentien, D., Dumont, A. G., Rapinat, A., Desjardins, L., ... Marais, R. (2013). SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discovery*, 3(10), 1122–1129. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0330>
- Gallie, B. L., Simpson, E. R., Saakyan, S., Amiryan, A., Valskiy, V., Finger, P. T., ... Aihara, Y. (2016). Local Recurrence Significantly Increases the Risk of Metastatic Uveal Melanoma. *Ophthalmology*, 123(1), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.09.014>
- Gebert, L. F. R., Rebhan, M. A. E., Crivelli, S. E. M., Denzler, R., Stoffel, M., & Hall, J. (2014). Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 609–621. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt852>
- Ghini, F., Rubolino, C., Climent, M., Simeone, I., Marzi, M. J., & Nicassio, F. (2018). Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation. *Nature Communications*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05182-9>

- Gilot, D., Migault, M., Bachelot, L., Journé, F., Rogiers, A., Donnou-Fournet, E., ... Galibert, M.-D. (n.d.). *A non-coding function of TYRP1 mRNA promotes melanoma growth*. <https://doi.org/10.1038/ncb3623>
- Goldgeier, M. H., Klein, L. E., & Klein-Angerer, S. (1984). The distribution of melanocytes in the leptomeninges of the human brain. *Journal of Investigative Dermatology*, *82*(3), 235–238. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260111>
- Grimson, A., Farh, K. K. H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., & Bartel, D. P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*, *27*(1), 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B. J., Chiang, H. R., King, N., ... Bartel, D. P. (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*, *455*(7217), 1193–1197. <https://doi.org/10.1038/nature07415>
- Griner, E. M., & Kazanietz, M. G. (2007, April). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 7, pp. 281–294. <https://doi.org/10.1038/nrc2110>
- Gu, S., Jin, L., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, F., Valdmanis, P. N., & Kay, M. A. (2012). The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell*, *151*(4), 900–911. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.042>
- Gudjohansen, S. A. H., Atacho, D. A. M., Gesbert, F., Raposo, G., Hurbain, I., Larue, L., ... Petersen, P. H. (2015). Meningeal Melanocytes in the Mouse: Distribution and Dependence on Mitf. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00149>
- Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., & Bartel, D. P. (2014). Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*, *15*(7), 409. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0409-z>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 15, pp. 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., ... Tuschl, T. (2010). Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell*, *141*(1), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.009>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., ... Kim, V. N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*, *125*(5), 887–901. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.043>
- Han, J., Pedersen, J. S., Kwon, S. C., Belair, C. D., Kim, Y. K., Yeom, K. H., ... Kim, V. N. (2009). Posttranscriptional Crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell*, *136*(1), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.053>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000, January 7). The hallmarks of cancer. *Cell*, Vol. 100, pp. 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011, March 4). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, Vol. 144, pp. 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanna, J., Hossain, G. S., & Kocerha, J. (2019). The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in Genetics*, *10*(MAY), 478. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00478>
- Hanniford, Doug, Zhong, J., Koetz, L., Gaziel-Sovran, A., Lackaye, D. J., Shang, S., ... Hernando, E. (2015). A miRNA-based signature detected in primary melanoma tissue predicts development of brain metastasis. *Clinical Cancer Research*, *21*(21), 4903–4912. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2566>
- Hanniford, Douglas, Ulloa-Morales, A., Karz, A., Berzoti-Coelho, M. G., Moubarak, R. S., Sánchez-Sendra, B., ... Hernando, E. (2020). Epigenetic Silencing of CDR1as Drives IGF2BP3-Mediated Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancer Cell*, *37*(1), 55-70.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.007>

- Hansen, T. B., Venø, M. T., Jensen, T. I., Schaefer, A., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2016). Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nature Communications*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms11538>
- Harbour, J. W., Onken, M. D., Roberson, E. D. O., Duan, S., Cao, L., Worley, L. A., ... Bowcock, A. M. (2010). Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science*, *330*(6009), 1410–1413. <https://doi.org/10.1126/science.1194472>
- Harbour, J. W., Roberson, E. D. O., Anbunathan, H., Onken, M. D., Worley, L. A., & Bowcock, A. M. (2013). Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. *Nature Genetics*, *45*(2), 133–135. <https://doi.org/10.1038/ng.2523>
- Harris, M. L., & Erickson, C. A. (2007, January). Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Developmental Dynamics*, Vol. 236, pp. 1–19. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20919>
- Hasler, D., Lehmann, G., Murakawa, Y., Klironomos, F., Jakob, L., Grässer, F. A., ... Meister, G. (2016). The Lupus Autoantigen La Prevents Mis-channeling of tRNA Fragments into the Human MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, *63*(1), 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.026>
- Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A. Z., & Kay, M. A. (2010). Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA*, *16*(4), 673–695. <https://doi.org/10.1261/rna.2000810>
- Hausser, J., & Zavolan, M. (2014). Identification and consequences of miRNA-target interactions-beyond repression of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 15, pp. 599–612. <https://doi.org/10.1038/nrg3765>
- Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., ... Takahashi, T. (2005). A polycistronic MicroRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Research*, *65*(21), 9628–9632. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2352>
- Hayward, N. K., Wilmott, J. S., Waddell, N., Johansson, P. A., Field, M. A., Nones, K., ... Mann, G. J. (2017). Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*, *545*(7653), 175–180. <https://doi.org/10.1038/nature22071>
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., & Tollervey, D. (2013). Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell*, *153*(3), 654–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.043>
- Henion, P. D., & Weston, J. A. (1997). Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development*, *124*(21), 4351–4359.
- Hikmet Budak, R. B. M. K. B. A. (2016). *MicroRNA Nomenclature and the Need for a Revised Naming Prescription* - PubMed. 65–71. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26148500/>
- Hinske, L. C. G., Galante, P. A. F., Kuo, W. P., & Ohno-Machado, L. (2010). A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome. *BMC Genomics*, *11*(1), 533. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-533>
- Hong, L., Simon, J. D., & Sarna, T. (2006, October). Melanin structure and the potential functions of uveal melanosomes. *Pigment Cell Research*, Vol. 19, pp. 465–466. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00330.x>
- Horsman DE, & White VA. (1993). *Cytogenetic analysis of uveal melanoma. Consistent occurrence of monosomy 3 and trisomy 8q.* - PubMed - NCBI. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8431862>
- Hu, D. N. (2000). Regulation of growth and melanogenesis of uveal melanocytes. *Pigment Cell Research*, *13*(SUPPL. 8), 81–86. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.13.s8.15.x>
- Hu, D. N., Simon, J. D., & Sarna, T. (2008, May). Role of ocular melanin in ophthalmic physiology and pathology. *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 84, pp. 639–644. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00316.x>
- Huang, E., Liu, R., & Chu, Y. (2015, August 1). MiRNA-15a/16: As tumor suppressors and

- more. *Future Oncology*, Vol. 11, pp. 2351–2363. <https://doi.org/10.2217/fon.15.101>
- Huppertz, I., Attig, J., D'Ambrogio, A., Easton, L. E., Sibley, C. R., Sugimoto, Y., ... Ule, J. (2014). iCLIP: Protein-RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods*, *65*(3), 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.10.011>
- Hutvagner, G., & Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, *297*(5589), 2056–2060. <https://doi.org/10.1126/science.1073827>
- Inoue, D., Chew, G. L., Liu, B., Michel, B. C., Pangallo, J., D'Avino, A. R., ... Bradley, R. K. (2019). Spliceosomal disruption of the non-canonical BAF complex in cancer. *Nature*, *574*(7778), 432–436. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1646-9>
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*, *39*(2), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.015>
- Jager, M. J., Shields, C. L., Cebulla, C. M., Abdel-Rahman, M. H., Grossniklaus, H. E., Stern, M.-H., ... Damato, B. E. (2020). Uveal melanoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, *6*(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0158-0>
- Jayawardana, K., Schramm, S. J., Tembe, V., Mueller, S., Thompson, J. F., Scolyer, R. A., ... Yang, J. (2016). Identification, review, and systematic cross-validation of microRNA prognostic signatures in metastatic melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, *136*(1), 245–254. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.355>
- Jensen, D. E., Proctor, M., Marquis, S. T., Gardner, H. P., Ha, S. I., Chodosh, L. A., ... Rauscher, F. J. (1998). BAP1: A novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, *16*(9), 1097–1112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201861>
- Jinek, M., & Doudna, J. A. (2009, January 22). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, Vol. 457, pp. 405–412. <https://doi.org/10.1038/nature07755>
- Johansson, P., Aoude, L. G., Wadt, K., Glasson, W. J., Warriar, S. K., Hewitt, A. W., ... Hayward, N. K. (2016). Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4. *Oncotarget*, *7*(4), 4624–4631. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6614>
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015, July 19). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 16, pp. 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *57*(1), 19–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>
- Jones, M. R., Blahna, M. T., Kozlowski, E., Matsuura, K. Y., Ferrari, J. D., Morris, S. A., ... Mizgerd, J. P. (2012). Zcchc11 Uridylates Mature miRNAs to Enhance Neonatal IGF-1 Expression, Growth, and Survival. *PLoS Genetics*, *8*(11), e1003105. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003105>
- Kaliki, S., Shields, C. L., & Shields, J. A. (2015). Uveal melanoma: Estimating prognosis. *Indian Journal of Ophthalmology*, *63*(2), 93–102. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.154367>
- Kamoto, D., Mitra, P., Davis, F., Osman, N., Chaplin, R., Cabot, P. J., ... Little, P. J. (2017, April 1). Gaq proteins: molecular pharmacology and therapeutic potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 74, pp. 1379–1390. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2405-9>
- Kamenska, A., Simpson, C., Vindry, C., Broomhead, H., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., ... Standart, N. (2016). The DDX6-4E-T interaction mediates translational repression and P-body assembly. *Nucleic Acids Research*, *44*(13), 6318–6334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw565>

- Kamenska A, Lu WT, Kubacka D, Broomhead H, Minshall N, Bushell M, & Standart N. (2014). *Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing.* - PubMed - NCBI. 3298–3313. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335285>
- Kato, M., Putta, S., Wang, M., Yuan, H., Lanting, L., Nair, I., ... Natarajan, R. (2009). TGF- β activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nature Cell Biology*, *11*(7), 881–889. <https://doi.org/10.1038/ncb1897>
- Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Sethupathy, P., Iizasa, H., Hatzigeorgiou, A. G., & Nishikura, K. (2007). Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science*, *315*(5815), 1137–1140. <https://doi.org/10.1126/science.1138050>
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010, July). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 35, pp. 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>
- Kim, D., Sung, Y. M., Park, J., Kim, S., Kim, J., Park, J., ... Baek, D. (2016). General rules for functional microRNA targeting. *Nature Genetics*, *48*(12), 1517–1526. <https://doi.org/10.1038/ng.3694>
- Kim, Y. J., Lee, S. C., Kim, S. E., Kim, S. H., Kim, S. K., & Lee, C. S. (2020). YAP Activity is Not Associated with Survival of Uveal Melanoma Patients and Cell Lines. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63391-z>
- Kim, Y. K., Kim, B., & Kim, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(13), E1881–E1889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602532113>
- King, I. N., Yartseva, V., Salas, D., Kumar, A., Heidersbach, A., Ando, D. M., ... Ivey, K. N. (2014). The RNA-binding Protein TDP-43 Selectively Disrupts MicroRNA-1/206 Incorporation into the RNA-induced Silencing Complex. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(20), 14263–14271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561902>
- Kingston, E. R., & Bartel, D. P. (2019). Global analyses of the dynamics of mammalian microRNA metabolism. *Genome Research*, *29*(11), 1777–1790. <https://doi.org/10.1101/gr.251421.119>
- Kirkwood, B. (2009). Albinism and its implications with vision. *Insight - Journal of the American Society of Ophthalmic Registered Nurses*, *34*(2), 13–16.
- Kivelä, T., Suci, S., Hansson, J., Kruit, W. H. J., Vuoristo, M. S., Kloke, O., ... Pyrhönen, S. (2003). Bleomycin, vincristine, lomustine and dacarbazine (BOLD) in combination with recombinant interferon alpha-2b for metastatic uveal melanoma. *European Journal of Cancer*, *39*(8), 1115–1120. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(03\)00132-1](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(03)00132-1)
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., ... Dalla-Favera, R. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*, *17*(1), 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.019>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Krantz, B. A., Dave, N., Komatsubara, K. M., Marr, B. P., & Carvajal, R. D. (2017). Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. *Clinical Ophthalmology*, Volume 11, 279–289. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S89591>
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010, September). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 11, pp. 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Krüger, J., & Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: MicroRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Research*, *34*(WEB. SERV. ISS.). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl243>
- Kumar, P., Anaya, J., Mudunuri, S. B., & Dutta, A. (2014). Meta-analysis of tRNA derived

- RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Medicine*, *12*(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0078-0>
- Kuscu, C., Kumar, P., Kiran, M., Su, Z., Malik, A., & Dutta, A. (2018). tRNA fragments (tRFs) guide Ago to regulate gene expression post-transcriptionally in a Dicer-independent manner. *RNA*, *24*(8), 1093–1105. <https://doi.org/10.1261/rna.066126.118>
- Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A. S., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Research*, *22*(9), 1634–1645. <https://doi.org/10.1101/gr.133553.111>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lander, E. S. (2011, February 10). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, Vol. 470, pp. 187–197. <https://doi.org/10.1038/nature09792>
- Lapadula, D., Farias, E., Randolph, C. E., Purwin, T. J., McGrath, D., Charpentier, T. H., ... Benovic, J. L. (2019). Effects of oncogenic G α q and G α 11 inhibition by FR900359 in uveal melanoma. *Molecular Cancer Research*, *17*(4), 963–973. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0574>
- Larue, L., Kumasaka, M., & Goding, C. R. (2003). β -catenin in the melanocyte lineage. *Pigment Cell Research*, *16*(3), 312–317. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00050.x>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO Journal*, *21*(17), 4663–4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, *23*(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lee, Y. S., Shibata, Y., Malhotra, A., & Dutta, A. (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes and Development*, *23*(22), 2639–2649. <https://doi.org/10.1101/gad.1837609>
- Levin, A. A. (2019, January 3). Treating disease at the RNA level with oligonucleotides. *New England Journal of Medicine*, Vol. 380, pp. 57–70. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1705346>
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005, January 14). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, Vol. 120, pp. 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, *115*(7), 787–798. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3)
- Leyvraz, S., Piperno-Neumann, S., Suci, S., Baurain, J. F., Zdzienicki, M., Testori, A., ... Keilholz, U. (2014). Hepatic intra-arterial versus intravenous fotemustine in patients with liver metastases from uveal melanoma (EORTC 18021): A multicentric randomized trial. *Annals of Oncology*, *25*(3), 742–746. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt585>
- Li, L., Song, Y., Shi, X., Liu, J., Xiong, S., Chen, W., ... Zhang, R. (2018). The landscape of miRNA editing in animals and its impact on miRNA biogenesis and targeting. *Genome Research*, *28*(1), 132–143. <https://doi.org/10.1101/gr.224386.117>
- Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., ...

- Bartel, D. P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development*, *17*(8), 991–1008. <https://doi.org/10.1101/gad.1074403>
- Lin, J. Y., & Fisher, D. E. (2007, February 22). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, Vol. 445, pp. 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature05660>
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., ... Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, *305*(5689), 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Loeb, G. B., Khan, A. A., Canner, D., Hiatt, J. B., Shendure, J., Darnell, R. B., ... Rudensky, A. Y. (2012a). Transcriptome-wide miR-155 Binding Map Reveals Widespread Noncanonical MicroRNA Targeting. *Molecular Cell*, *48*(5), 760–770. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.002>
- Loeb, G. B., Khan, A. A., Canner, D., Hiatt, J. B., Shendure, J., Darnell, R. B., ... Rudensky, A. Y. (2012b). Transcriptome-wide miR-155 Binding Map Reveals Widespread Noncanonical MicroRNA Targeting. *Molecular Cell*, *48*(5), 760–770. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.002>
- Lopes, V. S., Wasmeier, C., Seabra, M. C., & Futter, C. E. (2007). Melanosome maturation defect in Rab38-deficient retinal pigment epithelium results in instability of immature melanosomes during transient melanogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(10), 3914–3927. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-03-0268>
- Losko, M., Kotlinowski, J., & Jura, J. (2016). Long noncoding RNAs in metabolic syndrome related disorders. *Mediators of Inflammation*, Vol. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5365209>
- Lu, T., Chen, S., Qu, L., Wang, Y., Chen, H. D., & He, C. (2019). Identification of a five-miRNA signature predicting survival in cutaneous melanoma cancer patients. *PeerJ*, *2019*(10). <https://doi.org/10.7717/peerj.7831>
- Luke, J. J., Callahan, M. K., Postow, M. A., Romano, E., Ramaiya, N., Bluth, M., ... Carvajal, R. D. (2013). Clinical activity of ipilimumab for metastatic uveal melanoma: A retrospective review of the Dana-Farber Cancer Institute, Massachusetts General Hospital, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, and University Hospital of Lausanne experience. *Cancer*, *119*(20), 3687–3695. <https://doi.org/10.1002/cncr.28282>
- Luna, J. M., Scheel, T. K. H., Danino, T., Shaw, K. S., Mele, A., Fak, J. J., ... Darnell, R. B. (2015). Hepatitis C Virus RNA Functionally Sequesters miR-122. *Cell*, *160*(6), 1099–1110. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.025>
- Lyubasyuk, V., Ouyang, H., Yu, F. X., Guan, K. L., & Zhang, K. (2015). YAP inhibition blocks uveal melanogenesis driven by GNAQ or GNA11 mutations. *Molecular and Cellular Oncology*, *2*(1). <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.970957>
- M. Buzzacco, D. (2012). Long-Term Survivors with Metastatic Uveal Melanoma. *The Open Ophthalmology Journal*, *6*(1), 49–53. <https://doi.org/10.2174/1874364101206010049>
- Ma, J. B., Yuan, Y. R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2005). Structural basis for 5' -end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, *434*(7033), 666–670. <https://doi.org/10.1038/nature03514>
- MacRae, I. J., & Doudna, J. A. (2007, February 1). Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. 17, pp. 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.12.002>
- Mahendraraj, K., Lau, C., Lee, I., & Chamberlain, R. (2016). Trends in incidence, survival, and management of uveal melanoma: a population-based study of 7,516 patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1973–2012). *Clinical Ophthalmology*, Volume 10, 2113–2119. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S113623>
- Mariani, P., Piperno-Neumann, S., Servois, V., Berry, M. G., Dorval, T., Plancher, C., ... Salmon, R. J. (2009). Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. *European Journal of Surgical Oncology*, *35*(11), 1192–1197. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2009.02.016>

- Martin, M., Maßhöfer, L., Temming, P., Rahmann, S., Metz, C., Bornfeld, N., ... Zeschnigk, M. (2013). Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nature Genetics*, *45*(8), 933–936. <https://doi.org/10.1038/ng.2674>
- Masoomian, B., Shields, J. A., & Shields, C. L. (2018, June 1). Overview of BAP1 cancer predisposition syndrome and the relationship to uveal melanoma. *Journal of Current Ophthalmology*, Vol. 30, pp. 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.joco.2018.02.005>
- Matsui Masayuki, Y. C. H. Z. K. T. G. S. S. S. K. M. M. D. R. C. B. A. J. (2013). *Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes*. 10086–10109. Retrieved from <https://academic.oup.com/nar/article/41/22/10086/2436414>
- Matsunaga, T., Mutai, H., Namba, K., Morita, N., & Masuda, S. (2013). Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type i. *Acta Oto-Laryngologica*, *133*(4), 345–351. <https://doi.org/10.3109/00016489.2012.744470>
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., ... Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *378*(5), 439–448. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>
- McLaughlin, C. C., Wu, X.-C., Jemal, A., Martin, H. J., Roche, L. M., & Chen, V. W. (2005). Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. *Cancer*, *103*(5), 1000–1007. <https://doi.org/10.1002/cncr.20866>
- Meijer, H. A., Smith, E. M., & Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: Follow the leader? *Biochemical Society Transactions*, *42*(4), 1135–1140. <https://doi.org/10.1042/BST20140142>
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, *15*(2), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>
- Migault, M., Donnou-Fournet, E., Galibert, M.-D., & Gilot, D. (2017). Definition and identification of small RNA sponges: Focus on miRNA sequestration. *Methods*, *117*, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.012>
- Miller, P. E. (2008). Uvea. In *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* (pp. 203–229). <https://doi.org/10.1016/B978-072160561-6.50014-9>
- Mitra, A., Pfeifer, K., & Park, K. S. (2018). Circular RNAs and competing endogenous RNA (ceRNA) networks. *Translational Cancer Research*, *7*(Suppl 5), S624–S628. <https://doi.org/10.21037/tcr.2018.05.12>
- Möller, I., Murali, R., Müller, H., Wiesner, T., Jakkett, L. A., Scholz, S. L., ... Griewank, K. G. (2017). Activating cysteinyl leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) mutations in blue nevi. *Modern Pathology*, *30*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.201>
- Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D. J., Thuenemann, E. C., & Baulcombe, D. C. (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, *447*(7148), 1126–1129. <https://doi.org/10.1038/nature05903>
- Moore, A. R., Ceraudo, E., Sher, J. J., Guan, Y., Shoushtari, A. N., Chang, M. T., ... Chen, Y. (2016). Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma. *Nature Genetics*, *48*(6), 675–680. <https://doi.org/10.1038/ng.3549>
- Moore, M. J., Scheel, T. K. H., Luna, J. M., Park, C. Y., Fak, J. J., Nishiuchi, E., ... Darnell, R. B. (2015). MiRNA-target chimeras reveal miRNA 3'-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nature Communications*, *6*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms9864>
- Mort, R. L., Jackson, I. J., & Elizabeth Patton, E. (2015, February 15). The melanocyte lineage in development and disease. *Development (Cambridge)*, Vol. 142, pp. 620–632. <https://doi.org/10.1242/dev.106567>
- Moszyńska, A., Gebert, M., Collawn, J. F., & Bartoszewski, R. (2017). SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open Biology*, Vol. 7.

- <https://doi.org/10.1098/rsob.170019>
- Mouti, M. A., Dee, C., Coupland, S. E., & Hurlstone, A. F. L. (2016). Minimal contribution of ERK1/2-MAPK signalling towards the maintenance of oncogenic GNAQQ209P-driven uveal melanomas in zebrafish. *Oncotarget*, *7*(26), 39654–39670. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9207>
- Mulloikandov, G., Baccarini, A., Ruzo, A., Jayaprakash, A. D., Tung, N., Israelow, B., ... Brown, B. D. (2012). High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nature Methods*, *9*(8), 840–846. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2078>
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*, *2*(4), 279–289. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Navarro, F., & Lieberman, J. (2015). miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. *PLOS ONE*, *10*(7), e0132767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132767>
- Nguyen, T. A., Jo, M. H., Choi, Y. G., Park, J., Kwon, S. C., Hohng, S., ... Woo, J. S. (2015). Functional anatomy of the human microprocessor. *Cell*, *161*(6), 1374–1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.010>
- Nishikura, K. (2016, February 1). A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 17, pp. 83–96. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.4>
- Nishimura, T., Padamsi, Z., Fakim, H., Milette, S., Dunham, W. H., Gingras, A. C., & Fabian, M. R. (2015). The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs. *Cell Reports*, *11*(9), 1425–1436. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.065>
- Noland, C. L., & Doudna, J. A. (2013). Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA*, *19*(5), 639–648. <https://doi.org/10.1261/rna.037424.112>
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, *435*(7043), 839–843. <https://doi.org/10.1038/nature03677>
- Ohno, S. (1972). So much “junk” DNA in our genome. *Brookhaven Symposia in Biology*, *23*, 366–370. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5065367>
- Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M., & Lai, E. C. (n.d.). *The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in Drosophila*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.028>
- Olejniczak, M., Kotowska-Zimmer, A., & Krzyzosiak, W. (2018, January 1). Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 75, pp. 177–191. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2591-0>
- Ozgur, S., Basquin, J., Kamenska, A., Filipowicz, W., Standart, N., & Conti, E. (2015). Structure of a Human 4E-T/DDX6/CNOT1 Complex Reveals the Different Interplay of DDX6-Binding Proteins with the CCR4-NOT Complex. *Cell Reports*, *13*(4), 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.033>
- Ozsolak, F., Poling, L. L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X. S., Roeder, R. G., ... Fisher, D. E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes and Development*, *22*(22), 3172–3183. <https://doi.org/10.1101/gad.1706508>
- Pan, D. (2010, October 19). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*, Vol. 19, pp. 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>
- Park, J. E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D. K., Chang, H., Jee, D., ... Kim, V. N. (2015). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, *475*(7355), 201–205. <https://doi.org/10.1038/nature10198>
- Park, M. S., Phan, H.-D., Busch, F., Hinckley, S. H., Brackbill, J. A., Wysocki, V. H., & Nakanishi, K. (2017). Human Argonaute3 has slicer activity. *Nucleic Acids Research*, *45*(20), 11867–11877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx916>

- Pawlica, P., Sheu-Gruttadauria, J., MacRae, I. J., & Steitz, J. A. (2020). How Complementary Targets Expose the microRNA 3' End for Tailing and Trimming during Target-Directed microRNA Degradation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 039321. <https://doi.org/10.1101/sqb.2019.84.039321>
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Vol. 1, p. 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Piatek, M. J., & Werner, A. (2014). Endogenous siRNAs: Regulators of internal affairs. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 1174–1179. <https://doi.org/10.1042/BST20140068>
- Pinto Yishay, Buchumenski Ilana, Levanon Erez Y, & Eisenberg Eli. (2018). Human Cancer Tissues Exhibit Reduced A-to-I Editing of miRNAs Coupled With Elevated Editing of Their Targets - PubMed. Retrieved May 28, 2020, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29165639/>
- Plonka, P. M., Passeron, T., Brenner, M., Tobin, D. J., Shibahara, S., Thomas, A., ... Schallreuter, K. U. (2009a). What are melanocytes really doing all day long...? *Experimental Dermatology*, 18(9), 799–819. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00912.x>
- Plonka, P. M., Passeron, T., Brenner, M., Tobin, D. J., Shibahara, S., Thomas, A., ... Schallreuter, K. U. (2009b). What are melanocytes *really* doing all day long...? *Experimental Dermatology*, 18(9), 799–819. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00912.x>
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., & Pandolfi, P. P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465(7301), 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nature09144>
- Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., ... Meltzer, P. S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*, 33(1), 19–20. <https://doi.org/10.1038/ng1054>
- Pópulo, H., Soares, P., Rocha, A. S., Silva, P., & Lopes, J. M. (2010). Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. *Melanoma Research*, 20(2), 107–117. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32832ccd09>
- Pulikkan, J. A., Dengler, V., Peramangalam, P. S., Peer Zada, A. A., Müller-Tidow, C., Bohlander, S. K., ... Behre, G. (2010). Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood*, 115(9), 1768–1778. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-240101>
- Qin, W., Chung, A. C. K., Huang, X. R., Meng, X. M., Hui, D. S. C., Yu, C. M., ... Lan, H. Y. (2011). TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(8), 1462–1474. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010121308>
- Quemener, A. M., Bachelot, L., Forestier, A., Donnou-Fournet, E., Gilot, D., & Galibert, M.-D. (2020). The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, e1594. <https://doi.org/10.1002/wrna.1594>
- Quevedo, W. C., Fitzpatrick, T. B., Pathak, M. A., & Jimbow, K. (1975). Role of light in human skin color variation. *American Journal of Physical Anthropology*, 43(3), 393–408. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330430321>
- Radhakrishnan, A., Badhrinarayanan Nirmala, Biswas Jyotirmay, & Krishnakumar Subramanian. (2009). *Analysis of chromosomal aberration (1, 3, and 8) and association of microRNAs in uveal melanoma* - PubMed. 2146–2154. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19898689/>
- Rajkumar, S., & Watson, I. R. (2016, July 12). Molecular characterisation of cutaneous melanoma: Creating a framework for targeted and immune therapies. *British Journal of Cancer*, Vol. 115, pp. 145–155. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.195>
- Randhawa, M., Huff, T., Valencia, J. C., Younossi, Z., Chandhoke, V., Hearing, V. J., &

- Baranova, A. (2009). Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue. *FASEB Journal*, *23*(3), 835–843. <https://doi.org/10.1096/fj.08-116327>
- Reid, G., Pel, M. E., Kirschner, M. B., Cheng, Y. Y., Mugridge, N., Weiss, J., ... van Zandwijk, N. (2013). Restoring expression of miR-16: A novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Annals of Oncology*, *24*(12), 3128–3135. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt412>
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquienelli, A. E., Bettlinger, J. C., Ruvkun, A. E., ... Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *403*(6772), 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Rennie, W., Kanoria, S., Liu, C., Mallick, B., Long, D., Wolenc, A., ... Ding, Y. (2016). STarMirDB: A database of microRNA binding sites. *RNA Biology*, *13*(6), 554–560. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1182279>
- Ricotta, D. N., & Frishman, W. (2012). Mipomersen. *Cardiology in Review*, *20*(2), 1. <https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e31823424be>
- Rietschel, P., Panageas, K. S., Hanlon, C., Patel, A., Abramson, D. H., & Chapman, P. B. (2005). Variates of Survival in Metastatic Uveal Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(31), 8076–8080. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.6534>
- Rishi, P., Koundanya, V. V., & Shields, C. L. (2015). Using risk factors for detection and prognostication of uveal melanoma. *Indian Journal of Ophthalmology*, *63*(2), 110–116. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.154373>
- Rissland, O. S., Hong, S. J., & Bartel, D. P. (2011). MicroRNA Destabilization Enables Dynamic Regulation of the miR-16 Family in Response to Cell-Cycle Changes. *Molecular Cell*, *43*(6), 993–1004. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.021>
- Robertson, A. G., Shih, J., Yau, C., Gibb, E. A., Oba, J., Mungall, K. L., ... Woodman, S. E. (2018). Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical. *Cancer Cell*, *33*(1), 151. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.12.013>
- Robertson, A. G., Shih, J., Yau, C., Gibb, E. A., Oba, J., Mungall, K. L., ... Zmuda, E. (2017). Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell*, *32*(2), 204–220.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.003>
- Rodrigues, M., de Koning, L., Coupland, S., Jochemsen, A., Marais, R., Stern, M.-H., ... Consortium, the U. C. 2020. (2019). So Close, yet so Far: Discrepancies between Uveal and Other Melanomas. A Position Paper from UM Cure 2020. *Cancers*, *11*(7), 1032. <https://doi.org/10.3390/cancers11071032>
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, *14*(10 A), 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>
- Rothé, F., Ignatiadis, M., Chaboteaux, C., Haibe-Kains, B., Kheddoumi, N., Majjaj, S., ... Sotiriou, C. (2011). Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PLoS ONE*, *6*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020980>
- Royer-Bertrand, B., Torsello, M., Rimoldi, D., El Zaoui, I., Cisarova, K., Pescini-Gobert, R., ... Rivolta, C. (2016). Comprehensive Genetic Landscape of Uveal Melanoma by Whole-Genome Sequencing. *American Journal of Human Genetics*, *99*(5), 1190–1198. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.09.008>
- Rózanowska, M., Sarna, T., Land, E. J., & Truscott, T. G. (1999). Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*(5–6), 518–525. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00234-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00234-2)
- Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (n.d.). *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. <https://doi.org/10.1038/nature05983>
- Rupaimoole, R., Wu, S. Y., Pradeep, S., Ivan, C., Pecot, C. V., Gharpure, K. M., ... Sood, A. K. (2014). Hypoxia-mediated downregulation of miRNA biogenesis promotes tumour

- progression. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6202>
- Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., ... Mo, Y. Y. (2009). p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3207–3212. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808042106>
- Saini, H. K., Griffiths-Jones, S., & Enright, A. J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45), 17719–17724. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703890104>
- Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., ... Agata, Y. (2009). The NF90-NF45 Complex Functions as a Negative Regulator in the MicroRNA Processing Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 29(13), 3754–3769. <https://doi.org/10.1128/mcb.01836-08>
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011, August 5). A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell*, Vol. 146, pp. 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>
- Salomon, W. E., Jolly, S. M., Moore, M. J., Zamore, P. D., & Serebrov, V. (2015). Single-Molecule Imaging Reveals that Argonaute Reshapes the Binding Properties of Its Nucleic Acid Guides. *Cell*, 162(1), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.029>
- Salzman, D. W., & Weidhaas, J. B. (2013). SNPping cancer in the bud: MicroRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 137, pp. 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.016>
- Sampath, D., Liu, C., Vasan, K., Sulda, M., Pudevalli, V. K., Wierda, W. G., & Keating, M. J. (2012). Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119(5), 1162–1172. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-351510>
- Schank, T. E., & Hassel, J. C. (2019). Immunotherapies for the Treatment of Uveal Melanoma—History and Future. *Cancers*, 11(8), 1048. <https://doi.org/10.3390/cancers11081048>
- Scheulen, M. E., Kaempgen, E., Keilholz, U., Heinzerling, L., Ochsenreither, S., Abendroth, A., ... Richly, H. (2017). STREAM: A randomized discontinuation, blinded, placebo-controlled phase II study of sorafenib (S) treatment of chemo-naïve patients (pts) with metastatic uveal melanoma (MUM). *Journal of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), 9511–9511. https://doi.org/10.1200/jco.2017.35.15_suppl.9511
- Schirle, N. T., & MacRae, I. J. (2012). The crystal structure of human argonaute2. *Science*, 336(6084), 1037–1040. <https://doi.org/10.1126/science.1221551>
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., ... Selbach, M. (2013, February 13). Corrigendum: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, Vol. 495, pp. 126–127. <https://doi.org/10.1038/nature11848>
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., ... Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>
- Seal, R. L., Chen, L., Griffiths-Jones, S., Lowe, T. M., Mathews, M. B., O'Reilly, D., ... Bruford, E. A. (2020). A guide to naming human non-coding RNA genes. *The EMBO Journal*, 39(6), e103777. <https://doi.org/10.15252/embj.2019103777>
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
- Shain, A. H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., ... Bastian, B. C. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *New England Journal of Medicine*, 373(20), 1926–1936. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502583>
- Shang, R., Baek, S. C., Kim, K., Kim, B., Kim, V. N., & Lai, E. C. (2020). Genomic Clustering

- Facilitates Nuclear Processing of Suboptimal Pri-miRNA Loci. *Molecular Cell*, 78(2), 303-316.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.009>
- Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y. B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S. O., ... Hung, M. C. (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature*, 497(7449), 383–387. <https://doi.org/10.1038/nature12080>
- Shin, C., Nam, J. W., Farh, K. K. H., Chiang, H. R., Shkumatava, A., & Bartel, D. P. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular Cell*, 38(6), 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.005>
- Shoushtari, A. N., & Carvajal, R. D. (2014, December 10). GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma. *Melanoma Research*, Vol. 24, pp. 525–534. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000121>
- Simon, B., & Uslu, U. (2018). CAR-T cell therapy in melanoma: A future success story? *Experimental Dermatology*, 27(12), 1315–1321. <https://doi.org/10.1111/exd.13792>
- Singh, A. D., & Topham, A. (2003). Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973–1997. *Ophthalmology*, 110(5), 956–961. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(03\)00078-2](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(03)00078-2)
- Sisley, K., Rennie, I. G., Parsons, M. A., Jacques, R., Hammond, D. W., Bell, S. M., ... Rees, R. C. (1997). Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 19(1), 22–28. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199705\)19:1<22::AID-GCC4>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199705)19:1<22::AID-GCC4>3.0.CO;2-2)
- Slijepcevic, P. (2018, December 1). Genome dynamics over evolutionary time: “C-value enigma” in light of chromosome structure. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 836, pp. 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.005>
- Sliney, D. H. (n.d.). How light reaches the eye and its components. *International Journal of Toxicology*, 21(6), 501–509. <https://doi.org/10.1080/10915810290169927>
- Smit, K. N., Chang, J., Derks, K., Vaarwater, J., Brands, T., Verdijk, R. M., ... Kilic, E. (2019). Aberrant microRNA expression and its implications for uveal melanoma metastasis. *Cancers*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060815>
- Stahlhut, C., & Slack, F. J. (2013). MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and clinical implications. *Genome Medicine*, 5(12), 111. <https://doi.org/10.1186/gm516>
- Stark, M. S., Gray, E. S., Isaacs, T., Chen, F. K., Millward, M., McEvoy, A., ... Hayward, N. K. (2019). A Panel of Circulating MicroRNAs Detects Uveal Melanoma With High Precision. *Translational Vision Science & Technology*, 8(6), 12. <https://doi.org/10.1167/tvst.8.6.12>
- Sunness, J. S., Ifrah, A., Wolf, R., Applegate, C. A., & Sparrow, J. R. (2020). Abnormal Visual Function Outside the Area of Atrophy Defined by Short-Wavelength Fundus Autofluorescence in Stargardt Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(4), 36. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.4.36>
- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254), 529–533. <https://doi.org/10.1038/nature08199>
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. (2016, September 25). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 428, pp. 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>
- TACHIBANA, M. (1999). Sound Needs Sound Melanocytes to Be Heard. *Pigment Cell Research*, 12(6), 344–354. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1999.tb00518.x>
- Tagawa, H., & Seto, M. (2005, September 15). A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma [11]. *Leukemia*, Vol. 19, pp. 2013–2016. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403942>
- Tan, S. M., & Lieberman, J. (2016). Capture and identification of mirna targets by biotin pulldown and RNA-seq. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1358, pp. 211–228). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3067-8_13

- Tan, W., Liu, B., Qu, S., Liang, G., Luo, W., & Gong, C. (2018, March 1). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review). *Oncology Letters*, Vol. 15, pp. 2735–2742. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7638>
- Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S. M., Ala, U., ... Pandolfi, P. P. (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell*, *147*(2), 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.029>
- Tay, Y., Rinn, J., & Pandolfi, P. P. (2014, January 15). The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature*, Vol. 505, pp. 344–352. <https://doi.org/10.1038/nature12986>
- Thody, A. J., Higgins, E. M., Wakamatsu, K., Ito, S., Burchill, S. A., & Marks, J. M. (1991). Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, *97*(2), 340–344. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12480680>
- Tominaga, K., Srikantan, S., Lee, E. K., Subaran, S. S., Martindale, J. L., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2011). Competitive Regulation of Nucleolin Expression by HuR and miR-494. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(20), 4219–4231. <https://doi.org/10.1128/mcb.05955-11>
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A. D., Filipowicz, W., Ramos, A., ... Rosenfeld, M. G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature*, *459*(7249), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nature08025>
- Tse, J. Y., Walls, B. E., Pomerantz, H., Yoon, C. H., Buchbinder, E. I., Werchniak, A. E., ... Granter, S. R. (2016). Melanoma arising in a nevus of Ito: novel genetic mutations and a review of the literature on cutaneous malignant transformation of dermal melanocytosis. *Journal of Cutaneous Pathology*, *43*(1), 57–63. <https://doi.org/10.1111/cup.12568>
- Uchida, S., & Dimmeler, S. (2015, February 13). Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circulation Research*, Vol. 116, pp. 737–750. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.302521>
- Vader, M. J. C., Madigan, M. C., Versluis, M., Suleiman, H. M., Gezgin, G., Gruis, N. A., ... Van Der Velden, P. A. (2017). GNAQ and GNA11 mutations and downstream YAP activation in choroidal nevi. *British Journal of Cancer*, *117*(6), 884–887. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.259>
- Van Der Ree, M. H., Van Der Meer, A. J., Van Nuenen, A. C., De Bruijne, J., Ottosen, S., Janssen, H. L., ... Reesink, H. W. (2016). Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *43*(1), 102–113. <https://doi.org/10.1111/apt.13432>
- van der Ree, Meike H., de Vree, J. M., Stelma, F., Willemse, S., van der Valk, M., Rietdijk, S., ... Reesink, H. W. (2017). Safety, tolerability, and antiviral effect of RG-101 in patients with chronic hepatitis C: a phase 1B, double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*, *389*(10070), 709–717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31715-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31715-9)
- Van Raamsdonk, C. D., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J. M., ... Bastian, B. C. (2009). Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*, *457*(7229), 599–602. <https://doi.org/10.1038/nature07586>
- Van Raamsdonk, C. D., Griewank, K. G., Crosby, M. B., Garrido, M. C., Vemula, S., Wiesner, T., ... Bastian, B. C. (2010). Mutations in *GNA11* in Uveal Melanoma. *New England Journal of Medicine*, *363*(23), 2191–2199. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000584>
- van Zandwijk, N., Pavlakis, N., Kao, S. C., Linton, A., Boyer, M. J., Clarke, S., ... Reid, G. (2017). Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *The Lancet Oncology*, *18*(10), 1386–1396. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30621-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30621-6)
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation:

- MicroRNAs can up-regulate translation. *Science*, *318*(5858), 1931–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>
- Ventii, K. H., Devi, N. S., Friedrich, K. L., Chernova, T. A., Tighiouart, M., Van Meir, E. G., & Wilkinson, K. D. (2008). BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Research*, *68*(17), 6953–6962. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0365>
- Wade, N. J., & Finger, S. (2001). The eye as an optical instrument: From camera obscura to Helmholtz's perspective. *Perception*, *30*(10), 1157–1177. <https://doi.org/10.1068/p3210>
- Wakamatsu, K., Hu, D. N., McCormick, S. A., & Ito, S. (2008). Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. *Pigment Cell and Melanoma Research*, *21*(1), 97–105. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2007.00415.x>
- Wang, L., Zhao, Z., Ozark, P. A., Fantini, D., Marshall, S. A., Rendleman, E. J., ... Shilatifard, A. (2018). Resetting the epigenetic balance of Polycomb and COMPASS function at enhancers for cancer therapy. *Nature Medicine*, *24*(6), 758–769. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0034-6>
- Wang, S., Zhu, W., Xu, J., Guo, Y., Yan, J., Meng, L., ... Lu, S. (2019). Interpreting the MicroRNA-15/107 family: Interaction identification by combining network based and experiment supported approach. *BMC Medical Genetics*, *20*(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0824-9>
- Wang, W. X., Danaher, R. J., Miller, C. S., Berger, J. R., Nubia, V. G., Wilfred, B. S., ... Nelson, P. T. (2014). Expression of miR-15/107 family microRNAs in human tissues and cultured rat brain cells. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, *12*(1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2013.10.003>
- Wang, X., Xu, X., Ma, Z., Huo, Y., Xiao, Z., Li, Y., & Wang, Y. (2011). Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5. *RNA*, *17*(8), 1511–1528. <https://doi.org/10.1261/rna.2732611>
- Wang Y, Luo J, Zhang H, & Lu J. (2016). *microRNAs in the Same Clusters Evolve to Coordinately Regulate Functionally Related Genes*. 2232–2247. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189568>
- Wee, L. M., Flores-Jasso, C. F., Salomon, W. E., & Zamore, P. D. (2012). Argonaute divides Its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell*, *151*(5), 1055–1067. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.036>
- Weinberg, R. (2013). *The Biology of Cancer, Second Edition*. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=MzMmAgAAQBAJ&pgis=1>
- Weis, E., Shah, C. P., Lajous, M., Shields, J. A., & Shields, C. L. (2006). The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: A meta-analysis. *Archives of Ophthalmology*, *124*(1), 54–60. <https://doi.org/10.1001/archophth.124.1.54>
- Wen, J., Ladewig, E., Shenker, S., Mohammed, J., & Lai, E. C. (2015). Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. *PLOS Computational Biology*, *11*(9), e1004441. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004441>
- White, V. A., Chambers, J. D., Courtright, P. D., Chang, W. Y., & Horsman, D. E. (1998). Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma. *Cancer*, *83*(2), 354–359. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19980715\)83:2<354::AID-CNCR20>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19980715)83:2<354::AID-CNCR20>3.0.CO;2-R)
- Wiesinger, M., März, J., Kummer, M., Schuler, G., Dörrie, J., Schuler-Thurner, B., & Schaft, N. (2019). Clinical-scale production of car-t cells for the treatment of melanoma patients by mrna transfection of a cspg4-specific car under full gmp compliance. *Cancers*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/cancers11081198>
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, *75*(5), 855–862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)

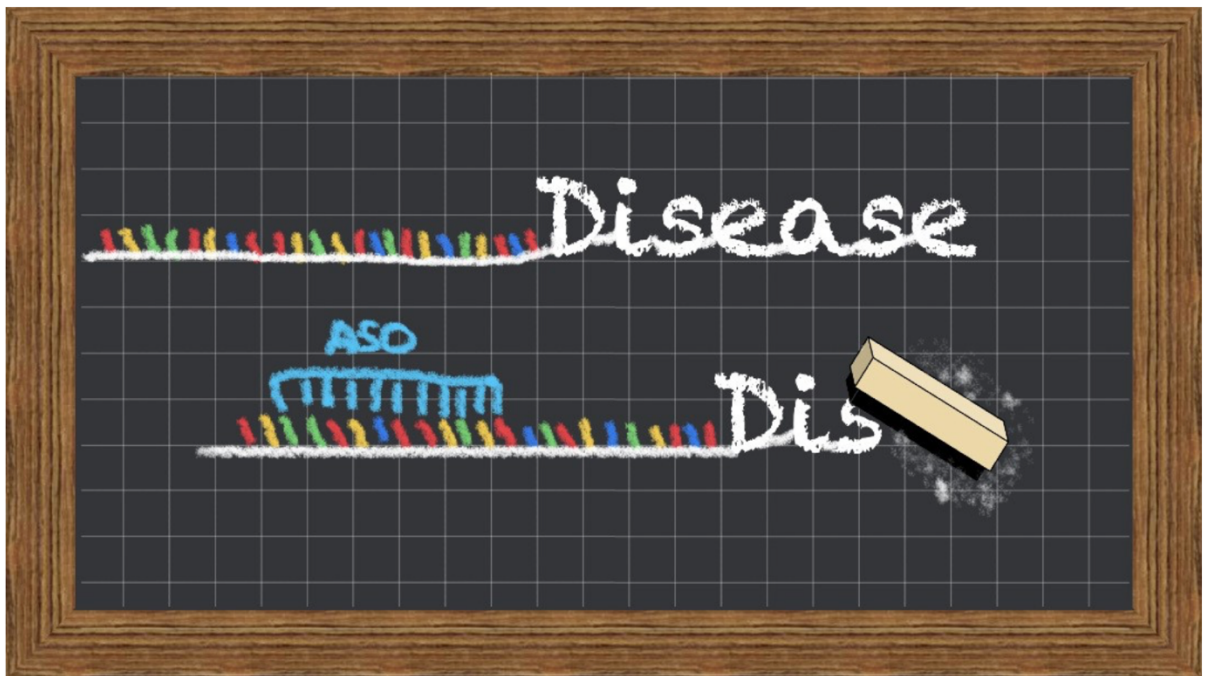
- Willson, J. K. V., Albert, D. M., Diener-West, M., McCaffrey, L., Mo, C. S., Scully, R. E., ... Zimbric, M. (2001). Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the collaborative ocular melanoma study (coms) coms report no. 15. *Archives of Ophthalmology*, *119*(5), 670–676. <https://doi.org/10.1001/archophth.119.5.670>
- Wilson, R. C., Tambe, A., Kidwell, M. A., Noland, C. L., Schneider, C. P., & Doudna, J. A. (2015). Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian MicroRNA biogenesis. *Molecular Cell*, *57*(3), 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.030>
- Worley, L. A., Long, M. D., Onken, M. D., & Harbour, J. W. (2008). Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. *Melanoma Research*, *18*(3), 184–190. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3282feeac6>
- Yaar, M., & Park, H. Y. (2012, March 1). Melanocytes: A window into the nervous system. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 132, pp. 835–845. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.386>
- Yajima, I., & Larue, L. (2008). The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment Cell and Melanoma Research*, *21*(4), 471–476. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00483.x>
- Yamakuchi, M., & Lowenstein, C. J. (2009, March 1). MiR-34, SIRT1 and p53: The feedback loop. *Cell Cycle*, Vol. 8, pp. 712–715. <https://doi.org/10.4161/cc.8.5.7753>
- Yang, J., Manson, D. K., Marr, B. P., & Carvajal, R. D. (2018, January 1). Treatment of uveal melanoma: where are we now? *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, Vol. 10. <https://doi.org/10.1177/1758834018757175>
- Yang, Q., Li, W., She, H., Dou, J., Duong, D. M., Du, Y., ... Mao, Z. (2015). Stress induces p38 MAPK-mediated phosphorylation and inhibition of drosha-dependent cell survival. *Molecular Cell*, *57*(4), 721–734. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.004>
- Yang, S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., ... Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(34), 15163–15168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006432107>
- Yang, W., Chendrimada, T. P., Wang, Q., Higuchi, M., Seeburg, P. H., Shiekhattar, R., & Nishikura, K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nature Structural and Molecular Biology*, *13*(1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nsmb1041>
- Yanwen Guo, Jun Liu, Sarah J. Eifenbein, Yinghong Ma, Mei Zhong, Caihong Qiu, Ye Ding, and J. L. (2015). *Characterization of the mammalian miRNA turnover landscape*. - PDF Download Free. Retrieved from https://docksci.com/characterization-of-the-mammalian-mirna-turnover-landscape_5a6690cdd64ab2f7cc236965.html
- Yasui, F., Miyazu, M., Yoshida, A., Naruse, K., & Takai, A. (2008). Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using YM-254890, an inhibitor of the G q/11 protein. *British Journal of Pharmacology*, *154*(4), 890–900. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.140>
- Ye, M., Hu, D., Tu, L., Zhou, X., Lu, F., Wen, B., ... Qu, J. (2008). Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in hepatocyte growth factor-induced migration of uveal melanoma cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *49*(2), 497–504. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0975>
- Yekta, S., Shih, I. H., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, *304*(5670), 594–596. <https://doi.org/10.1126/science.1097434>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, *17*(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Giraldez, A. J., & Tomari, Y.

- (2013). Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of argonaute2-cleaved precursor microRNAs. *Cell Reports*, 5(3), 715–726. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.029>
- Yu, F. X., Luo, J., Mo, J. S., Liu, G., Kim, Y. C., Meng, Z., ... Guan, K. L. (2014). Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP. *Cancer Cell*, 25(6), 822–830. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.017>
- Yu, H., Pak, H., Hammond-Martel, I., Ghram, M., Rodrigue, A., Daou, S., ... Affar, E. B. (2014). Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 285–290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309085110>
- Zaman, A., Wu, W., & Bivona, T. G. (2019, August 1). Targeting oncogenic braf: Past, present, and future. *Cancers*, Vol. 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11081197>
- Zecca, L., Bellei, C., Costi, P., Albertini, A., Monzani, E., Casella, L., ... Zucca, F. A. (2008). New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17567–17572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808768105>
- Zecca, L., Casella, L., Albertini, A., Bellei, C., Zucca, F. A., Engelen, M., ... Sarna, T. (2008). NEUROMELANIN CAN PROTECT AGAINST IRON MEDIATED OXIDATIVE DAMAGE IN SYSTEM MODELING IRON OVERLOAD OF BRAIN AGING AND PARKINSONS DISEASE. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1866–1875. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05541.x>
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M. S., Giannakakis, A., ... Coukos, G. (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9136–9141. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508889103>
- Zhu, C., Ren, C., Han, J., Ding, Y., Du, J., Dai, N., ... Jin, G. (2014). A five-microRNA panel in plasma was identified as potential biomarker for early detection of gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 110(9), 2291–2299. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.119>

Annexe

Annexe 1

Court article de présentation de la revue « *The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside* » (présentée en résultat n°2), paru sur le site *ADVANCED SCIENCE NEWS*¹ le 7 avril 2020



The repertoire of therapeutic options has improved drastically over the past few decades. Some of these options are remarkable, innovative, and at the frontiers of science, such as chimeric antigen receptor (CAR) T-cells for blood cancer.

¹ <https://www.advancedsciencenews.com/targeting-the-untargetable-and-treating-the-untreatable/>

But despite vast efforts to develop new therapeutics, some diseases remain, at least for now, undruggable. This mainly applies to rare diseases such as genetic disorders, but also to those that are more common and complex, including neurological disorders like Alzheimer's as well as solid tumors. Another major issue for cancer is the resistance to targeted therapies and relapses, demanding the urgent development of new drugs.

In these contexts where there is a lack of therapeutic options, a new class of therapeutics has emerged: antisense oligonucleotides (ASOs).

ASOs are short sequences of chemically modified oligonucleotides that have the capacity to enter the cellular compartment and bind specifically to RNA transcripts. Sequence complementarity with their target RNA warrants high specificity. The versatility of ASO functioning according to their modality of interaction with their target RNA constitute promising strategies for numerous pathologies.

In a recent article published in *WIREs RNA*, researchers show the span of possibilities offered by ASOs as a potential solution to this “therapeutic dead-end.” Virtually, ASOs bind specifically to their cognate RNA target and act as an eraser to correct a disorder.

To improve the ASO therapeutic index, key chemical modifications of the ASO backbone/structure have already been made to increase ASO stability, bioavailability, and tissue specificity, and to reduce toxicity. But further optimizations are still needed to raise the therapeutic index even more.

The working principle of ASOs is based on the mechanisms of RNA interference discovered a few years ago. The idea was to recapitulate miRNA-induced mRNA decay. ASOs can be designed to target any mRNA in order to reduce its quantity — in this way, they mimic endogenous miRNA. By using different chemical modifications, it is possible to extend their mode of action to non-degradation activity.

ASOs can thus act as steric blockers to correct or force splicing, obstruct mRNA degradation by miRNA, or release sequestered protein. The versatility of their mode of action makes ASO a very promising option for many diseases. Numerous molecules are already FDA- and/or EMA-approved and many more are currently being tested in clinical trials.

ASOs are not only a so-called “targeted therapy,” acting only in cells expressing the target RNA. They may constitute one of the most advanced strategies in personalized medicine. The flexibility of their design offers the possibility to target any alteration in a given cell of a single patient.

This flexibility has been demonstrated recently. Milasen, an FDA-approved molecule, was designed for a single young girl with a rare neurological disorder caused by a never-before-seen genetic mutation. This case was a real revolution for drug development and orphan diseases.

ASOs open a new avenue of personalized medicine and could potentially revolutionize practice medicine. The time has come for researchers, clinicians, and companies to use the blackboard approach to design ASOs by hand to cure their favorite disorders.

Article written by Anaïs M. Quemener and Marie-Dominique Galibert

Reference: A.M. Quemener et al. ‘The powerful world of antisense oligonucleotides: From bench to bedside.’ WIREs RNA (2020). DOI: 10.1002/wrna.1594

Titre : Mécanisme de régulation de l'activité du microARN miR-16 dans le mélanome uvéal

Mots clés : Suppresseur de tumeur, interactome des miARN, miR-16, mélanome uvéal, appariement non canonique, targetome des miARN

Résumé : L'altération de l'expression de miARN peut être associée à la survenue de maladie comme le cancer. C'est notamment le cas lorsqu'un miARN, possédant une activité suppresseur de tumeur, est sous-exprimé. Nous avons montré que le miR-16, puissant suppresseur de tumeur était impliqué dans l'agressivité du mélanome uvéal, non pas par son niveau d'expression mais par une réduction de son activité (miARN séquestré).

Nous avons identifié les ARN interagissant avec le miR-16 dans le mélanome uvéal (interactome du miR-16). L'interactome du miR-16 comprend les cibles classiques du miR-16, c'est-à-dire les ARN dont la liaison du miR-16 entraîne leur dégradation, mais également des ARN sur lesquels miR-16 se fixe et se trouve séquestré.

Cette absence de dégradation s'explique par le fait que le miR-16 se lie sur des éléments de réponse au miARN non canonique. Nous montrons que ces liaisons non canoniques mobilisent une partie du pool cellulaire de miR-16 et par conséquent réduisent son activité suppresseur de tumeur. De plus, nous confirmons que la liaison d'un miARN sur un site de liaison non canonique peut entraîner une surexpression à la fois de l'ARN et de la protéique.

Notre évaluation de l'activité suppresseur de tumeur du miR-16 (interactome) permet de prédire la survie des patients atteints de mélanome uvéal.

Cette thèse illustre donc l'importance de considérer non seulement l'expression des miARN mais aussi leur disponibilité pour pouvoir évaluer leur activité.

Title : Regulation of miR-16 activity in uveal melanoma

Keywords : Tumor suppressor, miRNA interactome, miR-16, Uveal Melanoma, non canonical base pairing, miRNA targetome

Abstract : Altered miRNA expression may be associated with the occurrence of diseases such as cancer. This is particularly the case when a miRNA with tumor suppressor activity is under-expressed. We have shown that miR-16, a potent tumor suppressor, is implicated in the aggressiveness of uveal melanoma, not by its level of expression but by a reduction in its activity (sequestered miRNA).

We have identified the RNAs interacting with miR-16 in uveal melanoma (miR-16 interactoma). The miR-16 interactome comprises the classical miR-16 targets, i.e. RNAs whose binding to miR-16 leads to their degradation, but also RNAs to which miR-16 binds and is sequestered.

This lack of degradation is explained by the fact that miR-16 binds to non canonical miR-16 response elements. We show that these non canonical bonds mobilize part of the miR-16 cell pool and consequently reduce its tumor suppressor activity. In addition, we confirm that the binding of miR-16 to a non canonical binding site can lead to overexpression of both RNA and protein.

Our evaluation of the tumor suppressor activity of miR-16 (interactoma) predicts the survival of patients with uveal melanoma.

This work thus illustrates the importance of considering not only the expression of miRNAs but also their availability in order to evaluate their activity.