



HAL
open science

Déterminants moléculaires et cellulaires des maladies rénales chroniques et de leurs complications

Romain Larrue

► **To cite this version:**

Romain Larrue. Déterminants moléculaires et cellulaires des maladies rénales chroniques et de leurs complications. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lille, 2024. Français. NNT : 2024ULILS026 . tel-04778204

HAL Id: tel-04778204

<https://theses.hal.science/tel-04778204v1>

Submitted on 12 Nov 2024

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

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille
École Doctorale Biologie - Santé

**DETERMINANTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES
DES MALADIES RENALES CHRONIQUES
ET DE LEURS COMPLICATIONS**

Romain Larrue

Soutenu le 17 octobre 2024

Thèse dirigée par

Pr Nicolas Pottier (Professeur des Universités – Praticien Hospitalier)

Jury :

Pr Christelle Cauffiez (Professeur des Universités)

Pr Claire Rigothier (Professeur des Universités – Praticien Hospitalier)

Dr Anne Fogli (Maitre de Conférence Universitaire – Praticien Hospitalier)

RESUME

La maladie rénale chronique est définie indépendamment de sa cause, par la présence, pendant plus de 3 mois, de marqueurs d'atteinte rénale ou d'une baisse du débit de filtration glomérulaire estimé (DFG estimé) au-dessous de 60 ml/min/1,73 m². Elle est associée à un risque accru de progression vers l'insuffisance rénale chronique terminale et à une diminution de la survie des patients. Les options thérapeutiques restent limitées et reposent essentiellement sur la dialyse et la transplantation rénale.

Le projet de thèse proposé vise à identifier de nouveaux déterminants moléculaires et cellulaires associés à la maladie rénale chronique et ses complications en s'appuyant sur différentes entités cliniques. D'une part, la recherche de facteurs génétiques impliqués dans la pathogenèse de certaines néphropathies héréditaires telles que la néphronoptose ou le syndrome d'Alport a été appréhendée par des techniques analytiques innovantes telles que le séquençage à haut débit. D'autre part, l'implication d'un microARN, miR-21, a été évalué dans un modèle murin de néphropathie secondaire où les lésions rénales sont induites par l'exposition à un agent anticancéreux, le cisplatine.

Nos résultats ont permis l'identification de nouveaux variants génétiques jouant un rôle causal dans le syndrome d'Alport et la néphronoptose à l'aide d'une stratégie analytique permettant le séquençage complet du génome. Par ailleurs, nos données suggèrent également que miR-21 aurait un rôle néphroprotecteur et que sa modulation pharmacologique permettrait d'éviter la survenue d'une insuffisance rénale chronique chez le patient recevant des chimiothérapies à base de dérivés du platine.

Au total, les résultats obtenus dans ce travail devraient permettre de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie rénale chronique et pourrait aboutir à plus ou moins long terme à de nouvelles options thérapeutiques.

- Maladie Rénale Chronique
- Néphropathie Héréditaire
- Séquençage Haut-Débit
- Fibrose

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) is defined, regardless of its primary cause, by the presence, for more than 3 months, of markers of kidney damage or a decrease in estimated glomerular filtration rate below 60 ml/min/1.73 m². CKD is associated with an increased risk of progression to end-stage renal disease as well as decreased patient survival. Therapeutic options remain limited and rely primarily on dialysis and renal transplantation.

This thesis project aims at identifying novel molecular and cellular determinants associated with CKD and its complications based on different clinical entities. On the one hand, the search for genetic factors involved in the pathogenesis of certain hereditary nephropathies such as nephronophthisis or Alport syndrome has been addressed using innovative analytical techniques such as high-throughput sequencing. On the other hand, the involvement of a particular microRNA, miR-21, was evaluated in a mouse model of secondary nephropathy where kidney damage is induced by exposure to an anticancer agent, cisplatin.

Our results allowed the identification of new genetic variants playing a causal role in Alport syndrome and nephronophthisis using an analytical strategy enabling complete genome sequencing. Furthermore, our data also suggest that miR-21 has a nephroprotective role and that its pharmacological modulation may prevent the occurrence of chronic renal failure in patients receiving chemotherapy including platinum derivatives.

Overall, the results obtained in this work provide a better understanding of the pathophysiology of chronic kidney disease and could lead to new therapeutic options in the more or less long term.

- Chronic Kidney Disease
- Hereditary Nephropathies
- High-Throughput Sequencing
- Fibrosis

REMERCIEMENTS

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

Le Professeur Claire Rigother et le Docteur Anne Fogli d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse ainsi que le Professeur Christelle Cauffiez d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je souhaite également remercier mon directeur de thèse, le Professeur Nicolas Pottier, pour m'avoir encadrée et accompagné tout au long de ces années.

Je remercie les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, le Professeur Marc Hazzan, Professeur Vincent Haufroid et le Docteur Michaël Perrais.

Je tiens également à remercier:

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

L'ensemble des membres du département de biochimie-biologie moléculaire,

Les membres de l'équipe Sandy Fellah, Cynthia Van der Hauwaert, Nihad Boukrout, Corentin De sousa, qui, par leur aide, ont permis la réalisation de ces travaux, ainsi que ceux avec lesquelles j'ai pu collaborer: Marine Goujon, Professeur François Glowacki et l'équipe de néphrologie de Lille,

Mais surtout,

Mes parents et mes frères, sans qui, rien n'aurait été possible,

Les petits, Colin, Valentin, Zoé qui ont encore tout leur avenir devant eux.

VALORISATIONS DES TRAVAUX DE THESE ET

TRAVAUX COLLABORATIFS

1. Delage C., Andreani M., Boukrout N., Perrais M., Cauffiez C., Pottier N., **Larrue R**. Whole-genome sequencing revealed a novel structural variant in *COL4A4* causing autosomal dominant Alport syndrome. En revue.
2. Truchi M, Savary G, Cadis H, Lebrigand K, Baeri A, Lingampally A, Girard-Riboulleau C, Scribe C, Magnone V, Arguel MJ, de Schutter C, Gautier-Isola M, Fassy J, Rezzonico R, **Larrue R**, Pluquet O, Perrais M, Hofman V, Marquette CH, Hofman P, Günther A, Ricard N, Barbry P, Leroy S, Cauffiez C, Bellusci S, Vassaux G, Pottier N, Mari B. Aging affects reprogramming of pulmonary capillary endothelial cells after lung injury. En revue.
3. Fages V, Bourre F, **Larrue R**, Wenzel A, Gibier JB, Bonte F, Dhaenens CM, Kidd K, Kmoch S, Bleyer A, Glowacki F, Grunewald O, 2024. Description of a New Simple and Cost-Effective Molecular Testing That Could Simplify MUC1 Variant Detection. **Kidney Int Rep.** 9(5),1451.
4. Hamroun A, Decaestecker A, **Larrue R**, Fellah S, Blum D, Van der Hauwaert C, Scherpereel A, Cortot A, Lenain R, Maanaoui M, Pottier N, Cauffiez C, Glowacki F, 2024. Daily Caffeine Consumption May Increase the Risk of Acute Kidney Injury Related to Platinum-Salt Chemotherapy in Thoracic Cancer Patients: A Translational Study. **Nutrients**, 16(6), 889.
5. Bourdon E, Swierczewski T, Goujon M, Boukrout N, Fellah S, Van der Hauwaert C, **Larrue R**, Lefebvre B, Van Seuningen I, Cauffiez C, Pottier N, Perrais M. MUC1 Drives the Progression and Chemoresistance of Clear Cell Renal Carcinomas. **Cancers (Basel)**. 2024 Jan 17;16(2):391.
6. **Larrue R**, Fellah S, Hennart B, Sabaoui N, Boukrout N, Van der Hauwaert C, Delage C, Cheok M, Perrais M, Cauffiez C, Allorge D, Pottier N. Integrating rare genetic variants into DPYD pharmacogenetic testing may help preventing fluoropyrimidine-induced toxicity. **Pharmacogenomics J.** 2024 Jan 12;24(1):1.
7. **Larrue R**, Fellah S, Boukrout N, De Sousa C, Lemaire J, Leboeuf C, Goujon M, Perrais M, Mari B, Cauffiez C, Pottier N, Van der Hauwaert C. miR-92a-3p regulates cisplatin-induced cancer cell death. **Cell Death Dis.** 2023 Sep 13;14(9):603.
8. Fellah S*, **Larrue R***, Truchi M, Vassaux G, Mari B, Cauffiez C, Pottier N. Pervasive role of the long noncoding RNA DNMT3OS in development and diseases. **Wiley Interdiscip Rev RNA.** 2023 Mar;14(2):e1736.*
Contributed equally
9. Dewaeles E, Carvalho K, Fellah S, Sim J, Boukrout N, Caillierez R, Ramakrishnan H, Van der Hauwaert C, Vijaya Shankara J, Martin N, Massri N, Launay A, Folger JK, de Schutter C, **Larrue R**, Loison I, Goujon M, Jung M, Le Gras S, Gomez-Murcia V, Faivre E, Lemaire J, Garat A, Beauval N, Maboudou P, Gnemmi V, Gibier JB, Buée L, Abbadie C, Glowacki F, Pottier N, Perrais M, Cunha RA, Annicotte JS, Laumet G, Blum D, Cauffiez C. Istradefylline protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin antitumor effects. **J Clin Invest.** 2022 Nov 15;132(22):e152924.
10. **Larrue R**, Fellah S, Van der Hauwaert C, Hennino MF, Perrais M, Lionet A, Glowacki F, Pottier N, Cauffiez C. The Versatile Role of miR-21 in Renal Homeostasis and Diseases. **Cells.** 2022 Nov 7;11(21):3525.
11. Goujon M, Woszczyk J, Gaudelot K, Swierczewski T, Fellah S, Gibier JB, Van Seuningen I, **Larrue R**, Cauffiez C, Gnemmi V, Aubert S, Pottier N, Perrais M. A Double-Negative Feedback Interaction between miR-21 and PPAR- α in Clear Renal Cell Carcinoma. **Cancers (Basel)**. 2022 Feb 4;14(3):795.
12. Lenain R, Maanaoui M, Hamroun A, **Larrue R**, Van Der Hauwaert C, Gibier JB, Gnemmi V, Gomis S, Labalette M, Broly F, Hennart B, Pottier N, Hazzan M, Cauffiez C, Glowacki F. Impact of Tacrolimus Daily Dose Limitation in Renal Transplant Recipients Expressing CYP3A5: A Retrospective Study. **J Pers Med.** 2021 Oct 2;11(10):1002.
13. Arrighi N, Moratal C, Savary G, Fassy J, Nottet N, Pons N, Clément N, Fellah S, **Larrue R**, Magnone V, Lebrigand K, Pottier N, Dechesne C, Vassaux G, Dani C, Peraldi P, Mari B. The FibromiR miR-214-3p Is Upregulated in Duchenne Muscular Dystrophy and Promotes Differentiation of Human Fibro-Adipogenic Muscle Progenitors. **Cells.** 2021 Jul 20;10(7):1832.
14. Lemaire J, **Larrue R**, Perrais M, Cauffiez C, Pottier N. Aspects fondamentaux du développement tumoral [Fundamental aspects of oncogenesis]. **Bull Cancer.** 2020. Nov;107(11):1148-1160.
15. **Larrue R**, Chamley P, Bardyn T, Lionet A, Gnemmi V, Cauffiez C, Glowacki F, Pottier N, Broly F. Diagnostic utility of whole-genome sequencing for nephronophthisis. **NPJ Genom Med.** 2020 Sep 21;5:38.
16. Maanaoui M, Lenain R, Hamroun A, Van der Hauwaert C, Lopez B, Gibier JB, Frimat M, Savary G, Hennart B, **Larrue R**, Pottier N, Broly F, Provôt F, Hazzan M, Glowacki F, Cauffiez C. Caveolin-1 rs4730751 single-nucleotide polymorphism may not influence kidney transplant allograft survival. **Sci Rep.** 2019 Oct 29;9(1):15541.

TABLE DES MATIERES

La Maladie Rénale Chronique	17
I. INTRODUCTION	17
1. Généralités	17
a. Epidémiologie	19
b. Etiologies	19
c. Facteurs de risque	19
2. Les MRC primitives	20
a. Mécanismes et conséquences des mutations	20
b. Nature des mutations	21
3. Nomenclature	21
a. Substitutions nucléotidiques	21
b. Insertions ou délétions d'un ou plusieurs nucléotide(s)	21
c. Mutations dynamiques	22
d. Réarrangements génomiques	23
e. Insertion d'éléments transposables	24
f. Conversion génique	24
g. Mécanismes épigénétiques	24
h. Mutations de novo, mosaïques germinales et somatiques	25
i. Conséquences des mutations sur la fonction de la protéine	25
j. Perte de fonction	26
k. Effet dominant négatif	26
l. Gain de fonction	26
m. Autres situations	27
n. Conséquences des mutations délétères sur l'expression du gène	27
II. LA NEPHRONOPHTISE	33
1. Le cil primaire	33
a. Structure et fonctions du cil primaire	34
b. Mécanismes et régulation de la ciliogenèse	36
2. La néphronophtise	39
a. Aspects cliniques et histologiques	41
III. SYNDROME D'ALPORT	45
1. Le collagène de type IV	45
a. Structure	45
2. Le syndrome d'Alport	48
a. Aspects génétiques	48
b. Aspects cliniques	49
c. Aspects histologiques	51

Les MRC secondaires :	53
I. ROLE DU CISPLATINE ET DE MiR-21	53
1. Le cisplatine : un agent néphrotoxique	53
a. Mécanisme d'action antitumorale	53
b. Néphrotoxicité du cisplatine	55
2. Le microARN MiR-21, un acteur en physiopathologie rénale	56
a. ARN non codants	56
b. Les microARN	57
c. miR-21 en physiologie et pathologie rénale	60
Travaux personnels	63
I. NEPHRONOPHTISE	63
II. SYNDROME D'ALPORT	64
Travaux personnels	65
I. ROLE DE MiR-92A-3P DANS LA REPOSE DES TUMEURS PULMONAIRES AU CISPLATINE	66
II. RESULTATS PRELIMINAIRES : ROLE DE MiR-21 DANS LA NEPHROTOXICITE INDUITE PAR LE CISPLATINE	67
III. MATERIEL ET METHODES	68
1. Modèle murin	68
2. Dosage de l'urée et de la créatinine	68
3. Analyse histologique	68
4. Mesure quantitative des miARN et des ARNm tissulaires	69
a. Extraction des ARN totaux	69
b. Expression des miARN	69
c. Expression des transcrits codants	70
d. Statistiques	70
IV. RESULTATS	71
1. Mise en place d'un modèle murin de néphrotoxicité induite par le cisplatine.	71
2. Impact de miR-21 sur les lésions rénales induites par le cisplatine	73
V. DISCUSSION	74
Discussion Générale	77
Conclusion	81
Références	83
Annexes	107

TABLE DES ILLUSTRATIONS

• FIGURES

Figure 1 : Exemples d'anomalies de séquence nucléotidique.....	22
Figure 2 : Représentation des principales anomalies de structure d'un gène.	23
Figure 3 : Différents impacts d'une mutation sur l'expression d'un gène.....	29
Figure 4 : Différentes anomalies modifiant la transcription d'un gène.	30
Figure 5 : Gènes impliqués dans la structure du cil primaire responsable de pathologies.....	33
Figure 6 : Structure d'un cil primaire.	34
Figure 7 : Voies intracellulaire et extracellulaire de la ciliogénèse.....	36
Figure 8 : Gènes impliqués dans la ciliogénèse et leurs pathologies associées.....	38
Figure 9 : Le cil primaire au cours du cycle cellulaire.....	38
Figure 10 : Aspect histologique de la néphronophtise juvénile.....	42
Figure 11 : Gènes impliqués dans les différentes formes de néphronophtise	44
Figure 12 : Gènes de la néphronophtise impliqués dans différentes formes de ciliopathies.	44
Figure 13 : Organisation du collagène au niveau de la membrane basale	46
Figure 14 : Structure de la triple hélice de collagène.	47
Figure 15 : Gènes COL4A1 à 6 codant pour les isoformes des chaînes alpha de collagène.....	48
Figure 16 : Atteinte glomérulaire en microscopie électronique (237).....	51
Figure 17 : Principaux sels de platines utilisés en chimiothérapie.....	53
Figure 18 : Mécanisme d'action du Cisplatine.	54
Figure 19 : Mécanisme d'action du Cisplatine (voie génotoxique).	55
Figure 20 : Taxonomie des ARN non codants.	56
Figure 21 : Etapes de biogénèse et de maturation des microARN (voie « canonique »).....	58
Figure 22 : Mécanisme de répression des miARN chez l'animal.	59
Figure 23 : Mécanismes d'action des miARN par boucles de rétrocontrôle	60
Figure 24 : Conséquences de l'administration de cisplatine sur le poids et la fonction rénale (modèle murin).	71
Figure 25 : Conséquences de l'administration de cisplatine sur le score histologique et l'expression de NGAL (modèle murin).	71
Figure 26 : Conséquences de l'administration de cisplatine sur l'expression de NGAL, HO-1 et miR-21	72
Figure 27 : Expression de miR-21 en fonction du sexe et du génotype.	72
Figure 28 : Expression des marqueurs d'atteinte rénale en fonction du génotype.	73
Figure 29 : Agents pharmacologiques inhibant l'action des micro-ARN.....	79

- **TABLES**

Tableau 1 : Stratification des risques dans la maladie rénale chronique (18).....	18
Tableau 2 : Liste des facteurs de risque d'initiation et de progression de la maladie rénale chronique.	20
Tableau 3 : Localisations et alias des gènes responsables de ciliopathies	40
Tableau 4 : Classifications des différentes formes de syndrome d'Alport.....	50
Tableau 5 : Critères histologiques permettant d'établir le score d'atteinte tubulaire.	68
Tableau 6 : Etudes cliniques et pré-cliniques en cours basées sur la régulation de l'expression des miARN.....	80

ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléotide
ADNc : ADN complémentaire
AGO2 : Argonaute 2
ARN : Acide RiboNucléotide
ARNm : ARN messenger
ARNnc : ARN non codant
ASO : Anti-Sens Oligonucleotide
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated protein
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein
Bak : Bcl-2-homologous Antagonist/Killer
Bax : Bcl2-Associated X protein
Bcl-XL : B-Cell Lymphoma-eXtra-Large
CisPt : Cisplatine
CKD : Chronic Kidney Disease
CNV : CNV pour Copy Number Variation
CNV : Copy Number Variant
Ct : Cycle Threshold
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire
DGCR8 : DiGeorge Critical Region 8
DROSHA : Drosha Ribonuclease III
ESE : Exonic Splicing Enhancer
ESS : Exonic Splicing Silencer
EXP5 : Exportine 5-Ran-GTP
FADD : Fas-Associated Death Domain
FSGS : Focal Segmental Glomerulo-Sclerosis
GFR : Glomerular Filtration Rate
GPCR : G-Protein-Coupled Receptors
hnRNP : Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HO-1 : Hème Oxygénase 1
HSF : Hyalinose Segmentaire et Focale
IEC : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion
IF : ImmunoFluorescence

ABREVIATIONS

IFT : Intraflagellar Transport

IHC : ImmunoHistoChimie

IL : Interleukine

IR(C)(T) : Insuffisance Rénale (Chronique) (Terminale)

ISE : Intronic Splicing Enhancer

ISS : Intronic Splicing Silencer

KIM1: Kidney Injury Molecule

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MBG : Membrane Basale Glomérulaire

MCDK : Multicystic Dysplastic Kidney

MCKD : Medullary Cystic Kidney Disease

ME : Microscopie Electronique

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

miARN : MicroARN

MLPA : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MMR Mismatch Repair

MO : Microscopie Optique

MRC : Maladie Renale Chronique

NER : Nucleotide Excision Repair

NGAL : Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin

NMD : Nonsense-Mediated mRNA decay

NPHP : Néphronoptise

NSD: Nonstop Mediated mRNA decay

Nt : Nucléotides

ORF : Open Reading Frame

P53 Upregulated Modulator of Apoptosis

PBR : Ponction-Biopsie Rénale

PBS : Phosphate Buffer Saline

PIDD : P53-Induced Death Domain protein 1

PPIA : Peptidylprolyl Isomerase A

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

qPCR : PCR quantitative

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

ROS : Reactiv Oxygen Species

ROS : Espèces Réactives à l'Oxygène

ABREVIATIONS

RP : Retinis Pigmentosa
SA : Syndrome d'Alport
SAAD : Syndrome d'Alport Autosomique Dominant
SAAR : Syndrome d'Alport Autosomique Récessif
SALX : Syndrome d'Alport lié à l'X
siARN : Small Interfering RNA
SN : Syndrome néphrotique
snoARN : ARN nucléolaire
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SV : Structural Variant
TNFR1 : Tumor Necrosis Factor 1
TNF- α : Tumor Necrosis Factor – alpha
TRADD : TNFR-Associated Death Domain
TSB : Target Site Blocker
TZ : Transition Zone
UTR : Untranslated Transcribed Region
WES : Whole Exome Sequencing
WGS : Whole Genome Sequencing

La Maladie Rénale Chronique

I. INTRODUCTION

1. Généralités

La maladie rénale chronique (MRC) fut longtemps ignorée du corps médical jusqu'à ce que Richard Bright, en 1827, améliore sa compréhension en associant l'atteinte rénale à la présence d'albumine dans les urines et la survenue d'œdème (1). Ainsi, un test simple permettait son diagnostic : la présence d'albumine dans les urines. Puis, la première moitié du XXème siècle est le témoin de grandes avancées dans la physiopathologie de la MRC se traduisant, d'une part, par le développement des méthodes d'épuration extra-rénale, en particulier la dialyse péritonéale et l'hémodialyse, et, d'autre part, par les débuts de la transplantation rénale à partir d'un donneur vivant apparenté (2). A partir des années 80, les connaissances acquises sur les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la progression de la maladie rénale permettent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à prévenir son évolution vers le stade terminal, notamment l'inhibition pharmacologique du système rénine angiotensine à l'aide d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (3). En parallèle, des progrès notables sont accomplis dans la prise en charge des complications métaboliques de la MRC telles que l'administration d'agents stimulant l'érythropoïèse dans le cadre du traitement de l'anémie ou encore la prescription de chélateurs du phosphore et de calcitriol pour lutter contre les troubles minéraux et osseux (4,5). Enfin, l'importance des complications cardiovasculaires au cours de la MRC est aussi reconnue qu'elles soient propres à la MRC (protéinurie, baisse du débit de filtration glomérulaire (DFG), complications métaboliques...) ou indépendantes (hypertension artérielle, obésité et diabète...)(6,7).

La maladie rénale chronique est définie par la persistance pendant plus de 3 mois d'anomalies de la structure ou la fonction rénale indépendamment de sa cause initiale (8,9). Ce processus, bien que généralement relativement lent et d'évolution graduelle, entraîne la destruction progressive du rein de manière irréversible (9–11). Ses capacités de filtration ne sont alors plus assurées avec pour conséquence l'installation d'une insuffisance rénale chronique (12). Si de nombreux marqueurs d'atteinte rénale peuvent contribuer au diagnostic de la MRC, l'estimation du DFG reste la méthode de choix pour évaluer la fonction rénale (13). En effet, en pratique clinique, le DFG est en général estimé à partir d'équations basées sur la cystatine C ou la créatinine sérique et d'autres paramètres comme le sexe, l'âge et l'ethnie. La formule

CKD-EPI, développée par la « Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration » est la plus utilisée à l'heure actuelle en pratique clinique (14). En effet, sa supériorité a été démontrée en termes de classification des patients dans les premiers stades de MRC, de prédiction de la mortalité et du risque d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale (15). L'albuminurie est un autre paramètre d'importance majeure dans le diagnostic de la MRC (11). Elle témoigne en effet d'une lésion de la barrière glomérulaire mais n'est pas spécifique d'une pathologie. Elle peut précéder la survenue d'une baisse du DFG (16). Une protéinurie majoritairement composée d'albumine indique une origine glomérulaire alors qu'une protéinurie composée à moins de 50% d'albumine oriente vers une origine tubulaire ou une protéinurie de surcharge (17). De plus, la détermination de l'albuminurie en association avec l'estimation du DFG permet une meilleure prédiction du risque de développer une insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) (11). Enfin, les dernières recommandations du groupe d'experts KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) préconisent de classer les patients en fonction du DFG, du taux d'albuminurie et de la cause de la MRC (Tableau 1 (18)). Cette classification a le mérite de mieux apprécier le pronostic des patients à moyen terme mais, comme toutes les classifications, expose le patient à un risque de surdiagnostic.

Tableau 1 : Stratification des risques dans la maladie rénale chronique (18).
Catégorisation des patients en plusieurs sous-groupes selon l'estimation du DFG et de l'albuminurie. Pour chaque groupe la couleur représente le risque : risque faible (vert), risque modéré (jaune), haut risque (orange), très haut risque (rouge). DFG : Débit de Filtration Glomérulaire.

			Persistent albuminuria categories (description and range)		
			A1	A2	A3
GFR categories (ml/min/1,73m ²) Description and range			Normal to midly increased	moderately increased	severely increased
			<30 mg/g <3mg/mmol	30-300 mg/g 3- 30mg/mmol	>300 mg/g >30mg/mmol
G1	Normal or high	≥ 90			
G2	Midly decreased	60-89			
G3a	Midly to moderately decreased	45-59			
G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
G4	Severely decreased	15-29			
G5	Kidney failure	<15			

En pratique, la MRC est évoquée devant la persistance d'un débit de filtration glomérulaire (DFG) inférieur à 60 mL/min/1,73m², de marqueurs de souffrance rénale, en particulier une albuminurie \geq 3 mg/mmol (soit 30 mg/g de créatinine) ou une protéinurie \geq 5 mg/mmol (soit 50 mg/g de créatinine), ou encore devant la détection d'anomalies morphologiques à l'échographie rénale telles que la présence de kystes ou d'une néphrocalcinose (19).

a. Epidémiologie

L'épidémiologie de la MRC est marquée depuis plusieurs décennies par une augmentation de sa prévalence (20). Plusieurs phénomènes permettent d'expliquer cette tendance, notamment le vieillissement de la population, l'augmentation de l'incidence du diabète de type 2 et de certaines maladies auto-immunes, et les nombreuses actions de sensibilisation visant à inciter les praticiens à un dépistage précoce (21,22). L'initiative GBD (Global Burden of Disease - <https://www.healthdata.org/research-analysis/gbd>) la place parmi les 30 principaux facteurs de risque en termes de nombre d'années de vie en bonne santé perdues en raison d'une morbidité et d'une mortalité élevées (23). Environ 500 millions (20) d'individus dans le monde seraient atteints de MRC avec d'importantes disparités en fonction des pays. En effet, une étude menée par l'International Society of Nephrology (<https://www.theisn.org>) montre par exemple une prévalence d'environ 30% en Chine (24) alors qu'elle est proche de 6% en Bolivie (25). Enfin, la MRC a un coût sociétal particulièrement élevé en particulier au stade terminal (26).

b. Etiologies

Les étiologies potentielles de MRC sont multiples et peuvent être schématiquement classées selon le segment du néphron lésé : atteintes glomérulaires (ex : glomérulonéphrites), vasculaires (ex : microangiopathies ou vascularites) et tubulo-interstitielles (toxicité médicamenteuse ou néphropathies obstructives chroniques)(12,27). Par ailleurs, la MRC peut également se développer sans qu'une maladie sous-jacente en soit la cause (28). On évoque dans ce cas une MRC primitive. Une origine génétique est souvent à mettre en cause et le diagnostic reposera en partie sur la recherche d'un ou plusieurs variant(s) pathogène(s) (29).

c. Facteurs de risque

Bien que de nombreux facteurs de risque d'initiation et de progression de la MRC aient été identifiés (Tableau 2), les mécanismes par lesquels ces facteurs contribuent au développement de la MRC sont encore mal connus à l'heure actuelle (30). Parmi ceux-ci, trois sont particulièrement importants : le vieillissement, le diabète et l'hypertension artérielle (31–33).

Tableau 2 : Liste des facteurs de risque d'initiation et de progression de la maladie rénale chronique.
AINS : anti-inflammatoire non stéroïdiens ; ATCD : antécédents

Facteurs de risque d'initiation	Facteurs de risque de progression
	Albuminurie/protéinurie
Age avancé	
Niveau socio-économique bas	
Génétique (polymorphismes des gènes liés au système rénine-angiotensine, à l'uromoduline, l'apolipoprotéine L1)	
ATCD familial de MRC	
Petit poids de naissance	Petit poids de naissance
Obésité	Obésité
Diabète	Défaut de contrôle glycémique
Hypertension artérielle	Défaut de contrôle de l'hypertension
Néphrotoxiques (Alcool, stupéfiants, métaux lourds, AINS)	Néphrotoxiques
Insuffisance rénale aiguë	
Lithiase rénale	
Obstruction, reflux ou infections voie urinaires	
	Diète riche en protéines

2. Les MRC primitives

a. Mécanismes et conséquences des mutations

L'identification des variants génétiques à l'origine de maladies héréditaires chez l'homme a connu ces dernières années un essor majeur grâce en particulier aux techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) (34). En effet, ces technologies ont permis d'augmenter de manière considérable les capacités d'analyse des laboratoires de génétique moléculaire en rendant possible le séquençage d'un ensemble de gènes impliqués dans une pathologie héréditaire hétérogène, de l'exome voire du génome complet d'un individu (35). Différents types de mutations peuvent être responsables de maladies génétiques, en particulier des microdélétions ou insertions de petite taille, des substitutions nucléotidiques, des mutations dynamiques ou encore de grands remaniements, en affectant non seulement la fonction de la protéine, mais également l'expression du gène (36,37). De plus, outre leur localisation dans les régions codantes, ces altérations moléculaires peuvent être également situées dans la fraction non codante du génome, au niveau des promoteurs, au sein des introns, voire à distance du gène (38).

b. Nature des mutations

On distingue essentiellement trois grandes classes de mutations : les substitutions nucléotidiques, les insertions/délétions de quelques paires de bases et les remaniements géniques de grande taille.

3. Nomenclature

La nomenclature des mutations est basée sur la nomenclature HGVS (« Human Genome Variation Society » ; <https://www.hgvs.org>) et repose principalement sur l'utilisation, d'une part, d'une lettre minuscule indiquant la nature de la séquence modifiée: g. pour une séquence d'ADN génomique, c. pour une séquence d'ADN complémentaire, p. pour une séquence protéique...et, d'autre part, sur sa numérotation en se rapportant à une séquence de référence extraite des bases de données et en précisant son numéro d'accès et sa version (exemple : NM_001818.3).

a. Substitutions nucléotidiques

Les substitutions nucléotidiques correspondent au remplacement d'une base nucléotidique par une autre et représentent environ 65% des mutations (39). On distingue, d'une part, les transversions, qui correspondent au remplacement d'une base purique (adénine ou guanine) par une base pyrimidique (cytosine ou thymine) ou inversement, et, d'autre part, les transitions définies par le remplacement d'une base pyrimidique ou purique par une autre base de même nature (40) (Figure 1b). Les substitutions nucléotidiques peuvent notamment être induites par certains agents mutagènes (molécules intercalantes, rayonnements...), par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène issues du métabolisme endogène, ou encore être la conséquence d'erreurs spontanées survenant lors de la réplication de l'ADN (41).

b. Insertions ou délétions d'un ou plusieurs nucléotide(s)

Les insertions ou délétions d'un ou plusieurs nucléotide(s) (moins de vingt) font partie des anomalies de séquences nucléotidiques relativement peu fréquentes et représentent environ 5 % des anomalies génétiques retrouvées dans le cadre du diagnostic des maladies héréditaires (39). Les insertions ou délétions de trois bases ou d'un multiple de trois bases sont quant à elles responsables au niveau protéique de l'insertion ou de la délétion d'un ou plusieurs acides aminés dont les conséquences sur la fonction du gène sont variables (42) (Figure 1c). Les délétions ou insertions qui ne sont pas des multiples de trois bases sont responsables au niveau des régions codantes d'un décalage du cadre de lecture ou « frame shift » conduisant généralement à l'apparition d'un codon stop prématuré et à la présence

d'une protéine tronquée, le plus souvent non fonctionnelle (42) (Figure 1d). Ces altérations moléculaires surviennent la plupart du temps au niveau de segments d'ADN constitués de répétitions nucléotidiques courtes disposées en tandem et font suite au glissement de l'ADN polymérase lors du processus de réplication en raison de l'appariement décalé de ces séquences répétées (43).

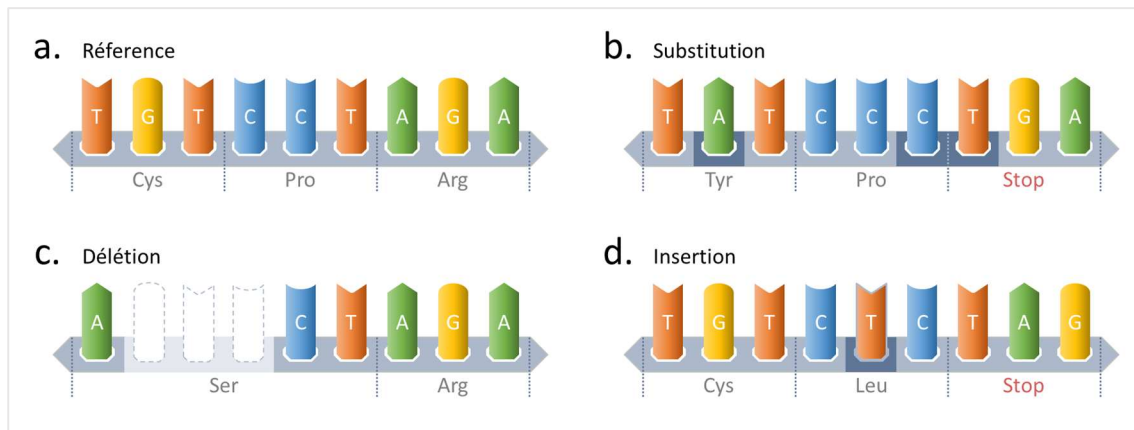


Figure 1 : Exemples d'anomalies de séquence nucléotidique.

Séquence de référence composée de 9 nucléotides, correspondant à 3 codons (a). Exemple de 3 substitutions responsables de différents types d'anomalies (b). Le variant du 1er codon G>A est responsable du changement d'acide aminé : variant « faux-sens ». Le variant du 2nd codon T>C n'entraîne pas de modification de l'acide aminé : variant « synonyme ». Le variant du 3ème codon A>T est responsable de l'apparition d'un codon Stop : variant « non-sens ». Une délétion (ou insertion) de nucléotides, multiples de 3, n'entraîne pas de décalage du cadre de lecture et ne modifie pas les acides aminés suivants. Au contraire, en cas d'insertion (ou délétion) de nucléotides, non multiple de 3, apparaît un décalage du cadre de lecture, modifiant alors les acides aminés suivants, et de manière fréquente, entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré (d).

c. Mutations dynamiques

La plupart des maladies génétiques liées à des mutations dynamiques impliquent la répétition de triplets nucléotidiques (44) (Figure 2a). On distingue les répétitions situées au niveau des séquences codantes des gènes (amplification de codons CAG généralement limitée), de celles affectant les régions du génome non codantes, où la taille de l'élément amplifié peut atteindre plusieurs kilobases (45). Les pathologies liées à des mutations dynamiques sont nombreuses et pour la plupart de type neurodégénératives comme la chorée de Huntington (45). Elles sont caractérisées par le phénomène d'anticipation qui correspond à un âge d'apparition des symptômes de plus en plus précoce et à une sévérité accrue de la maladie en raison de l'amplification du nombre de motifs répétés au cours des générations successives (45). Sur le plan moléculaire, plusieurs études suggèrent notamment, qu'au-delà d'un seuil d'environ cinquante répétitions, ces séquences formeraient des structures de type triple hélice ou épingles à cheveux anormales perturbant la réplication de l'ADN, favorisant ainsi l'expansion des triplets (46).

Des répétitions de trinuécléotides codant l'alanine ont également été décrites dans plusieurs pathologies développementales au niveau de différents facteurs de transcription tels que FOXL2 ou d'autres protéines nucléaires telles que PABPN1 jouant un rôle dans la maturation des transcrits (47–49). Ce type d'expansion serait à l'origine d'une altération du processus de repliement protéique responsable de l'agrégation pathologique des protéines anormales ou leur dégradation (49).

d. Réarrangements génomiques

Les réarrangements génomiques comme les délétions, les duplications, les inversions (Figure 2b) ou encore les translocations sont généralement issus d'événements de recombinaison homologue non allélique extra ou intrachromosomiques, au niveau de régions nucléotidiques très similaires, telles que les séquences répétées dispersées de type Alu (50,51). Ces réarrangements sont mis en évidence de manière récurrente dans plusieurs maladies héréditaires monogéniques comme les α thalassémies lorsqu'un seul gène est impliqué dans le réarrangement ou dans les syndromes dits « des gènes contigus » tels que le syndrome de Di-George, quand plusieurs gènes sont impliqués dans le réarrangement (52,53). Enfin, d'autres remaniements géniques non récurrents tels que ceux décrits dans les délétions du gène codant la dystrophine sont issus d'événements de recombinaison non homologue entre des régions nucléotidiques de faible similarité (50,54).

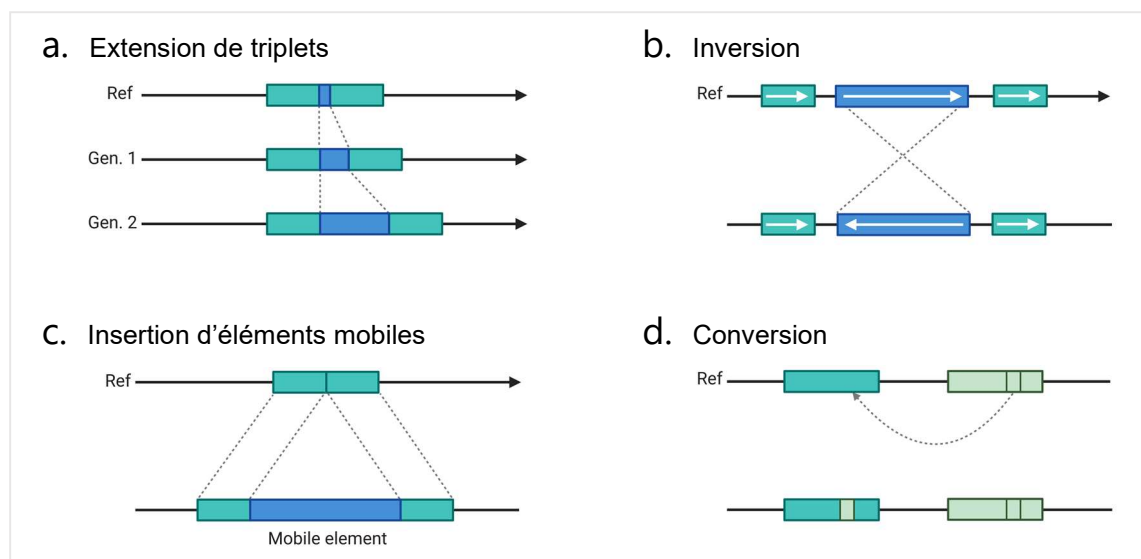


Figure 2 : Représentation des principales anomalies de structure d'un gène.

Exemple d'une expansion de triplet s'amplifiant au fil des générations (a). Lors de l'étape de transcription, en cas de présence de séquences homologues en amont et en aval du gène peuvent s'aligner anormalement et entraîner l'inversion du gène au niveau du brin fils (b). Un élément transposable peut s'insérer de manière aléatoire dans le génome, parfois au sein d'un gène (c). Deux gènes similaires ou la présence d'un pseudo-gène peuvent conduire à l'intégration d'une séquence au niveau du gène initial et correspond à une conversion génique (d).

e. Insertion d'éléments transposables

Environ la moitié du génome humain est constitué d'éléments transposables, des séquences nucléotidiques ayant la capacité de se mouvoir au sein du génome (55) (Figure 2c). On distingue d'une part, les rétrotransposons (plus de 40 % du génome humain) ayant recours à un intermédiaire ARN lors de leur mobilisation qui s'effectue selon un mécanisme de type « copier / coller » catalysé par une transcriptase inverse, et, d'autre part, les transposons (environ 3 % du génome humain), mobilisés sous forme d'ADN selon un mécanisme de type « couper / coller » catalysé par une transposase (55). Le déplacement des éléments transposables au sein du génome peut dans certains cas altérer le phénotype d'un individu notamment en cas d'insertion intra-génique ou au niveau des séquences régulant sa transcription (55). Par exemple, l'insertion du rétrotransposon LINE-1 (Long Interspersed Nucleotidic Elements-1) au niveau de l'exon 14 du gène codant le facteur de coagulation VIII est responsable de sa perte de fonction et de la survenue d'une pathologie héréditaire hémorragique, l'hémophilie A (56).

f. Conversion génique

La conversion génique, un type de recombinaison permettant le transfert unidirectionnel d'information génétique, est un mécanisme responsable de la substitution d'une séquence nucléotidique par une autre séquence d'ADN apparentée ou de nature allélique (57)(Figure 2d). Ce mécanisme peut induire au niveau du gène receveur le transfert d'une ou plusieurs mutation(s) délétère(s) présente(s) au niveau de la séquence donneuse (57). Par exemple, dans certains cas de maladie de Gaucher, la séquence donneuse est le pseudogène non fonctionnel de la β glucocérébrosidase ayant accumulé des mutations dont le transfert par conversion génique au niveau du gène de la β glucocérébrosidase est responsable de son inactivation (58).

g. Mécanismes épigénétiques

Alors que la majorité des gènes des mammifères sont exprimés de manière bi-allélique, certains gènes ont une expression mono-allélique qui dépend de leur origine parentale (59). Ce phénomène, appelé « empreinte génomique parentale » résulte d'une modification épigénétique du génome nucléaire et joue un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes comme *IGF2*, codant une hormone peptidique présentant des similarités structurelles et biologiques avec l'insuline (60). Ainsi, tout déséquilibre entre allèle maternel et allèle paternel au niveau des gènes soumis à empreinte parentale comme une disomie uniparentale peut être à l'origine d'une maladie génétique comme le syndrome de Prader Willi, un trouble du développement qui se caractérise par un défaut d'expression des gènes soumis à empreinte maternelle de la région chromosomique 15q11-q13 (61).

h. Mutations de novo, mosaïques germinales et somatiques

Dans certains cas, des anomalies génétiques dites *de novo*, ou néomutations, surviennent dans la lignée germinale essentiellement au cours des divisions cellulaires ayant lieu durant l'ovogenèse ou la spermatogenèse (34). Ce type de mutation est particulièrement fréquent pour certaines maladies génétiques comme la myopathie de Duchenne, l'hémophilie A ou encore l'achondroplasie. L'un des parents est en fait le plus souvent porteur d'une mosaïque germinale, c'est-à-dire que seul un clone de cellules germinales est porteur de la mutation (62). Contrairement à l'ovogenèse, la spermatogenèse se déroule de façon continue à partir de la puberté et comporte un plus grand nombre de divisions cellulaires (63). Par conséquent, le nombre total de divisions cellulaires est très différent entre l'homme et la femme (63). Ainsi, la fréquence des néomutations paternelles est supérieure à celle des mutations *de novo* maternelles et augmente avec l'âge (64). Par exemple, il est maintenant bien établi que les néomutations du gène *FGFR2*, à l'origine du syndrome d'Apert, sont majoritairement d'origine paternelle et associées à un âge paternel élevé (65). De plus, dans certains cas, l'anomalie génétique peut conférer un avantage prolifératif aux spermatogonies favorisant ainsi la transmission du variant génétique délétère. Enfin, des néomutations peuvent également survenir après la fécondation à un stade plus ou moins tardif de l'embryogenèse pour former des mosaïques somatiques dont les conséquences cliniques dépendent de la nature de l'altération moléculaire, du gène porteur de l'anomalie génétique et du tissu exprimant le gène altéré (63). Les mosaïques somatiques représentent vraisemblablement une des causes expliquant l'hétérogénéité clinique des maladies héréditaires et, d'un point de vue technique, constituent un piège diagnostique, étant donné que l'anomalie nucléotidique n'est présente qu'en faible proportion dans les cellules analysées (63).

i. Conséquences des mutations sur la fonction de la protéine

Les mutations ont des conséquences variées sur la protéine et ses fonctions biologiques. En effet, les mutations dites non-sens sont responsables de la formation de l'un des trois codons Stop UGA, UAA ou UAG, les anomalies génétiques à l'origine d'un décalage du cadre de lecture et celles altérant le codon d'initiation de la traduction, ont généralement des conséquences très délétères sur la fonction du gène, telles que un défaut de synthèse de la protéine ou la formation d'une protéine tronquée peu ou pas fonctionnelle. En revanche, les conséquences des mutations dites faux-sens ou des insertions/délétions ne perturbant pas le cadre de lecture sont plus difficiles à appréhender. Ces anomalies sont à l'origine d'une modification de la séquence primaire de la protéine et peuvent en particulier altérer sa stabilité, sa maturation, son adressage intracellulaire, son assemblage dans une structure multimérique, son activité enzymatique ou encore perturber ses interactions fonctionnelles

(66). Néanmoins, toute variation de la séquence primaire de la protéine ne se traduit pas systématiquement par une altération de ses propriétés biologiques (66). Ainsi, dans de nombreux cas, un faisceau d'arguments est nécessaire pour déterminer les conséquences fonctionnelles des anomalies génétiques au niveau protéique.

j. Perte de fonction

Les mutations perte de fonction sont responsables de l'absence d'expression de la protéine ou de la synthèse d'une protéine inactive (45). On distingue en particulier les allèles amorphes ou nuls (Figure 3b), à l'origine d'un déficit complet d'activité ou de la perte totale d'expression de la protéine, des allèles hypomorphes (Figure 3c) qui sont quant eux responsables d'une expression réduite de la protéine ou de la synthèse d'une protéine partiellement active (67). Les mutations perte de fonction sont notamment retrouvées dans la plupart des pathologies héréditaires récessives comme la mucoviscidose, où une altération des deux allèles est nécessaire pour que la maladie s'exprime (67). Elles sont également retrouvées dans les maladies dominantes par haplo-insuffisance, une situation dans laquelle le produit d'un seul allèle, bien qu'actif, est synthétisé en quantité insuffisante pour permettre un fonctionnement cellulaire normal (67) (Figure 3d).

k. Effet dominant négatif

Les mutations avec effet dominant négatif représentent une catégorie particulière de mutations de type perte de fonction (67). En effet, on parle d'effet dominant négatif lorsque le gène muté, appelé allèle antimorphe, induit non seulement une perte de fonction de la protéine qu'il code, mais interfère également avec la fonction de l'allèle normal chez les individus hétérozygotes (Figure 3e) (67). Ce type d'anomalie génétique est typiquement retrouvé au niveau des gènes codant des protéines multimériques, en particulier certaines protéines de structure comme les collagènes fibrillaires (67,68). Par exemple, dans l'ostéogenèse imparfaite, une maladie héréditaire caractérisée par des mutations délétères au niveau notamment des gènes codant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la triple hélice de collagène de type I, les mutations impactant la structure d'une chaîne α ont des conséquences plus délétères (effet dominant) que celles à l'origine de leur perte d'expression en entraînant la distorsion de la triple hélice de collagène (69).

l. Gain de fonction

Les mutations de type gain de fonction sont responsables d'une modification de la fonction du gène normal en induisant sa surexpression (allèles hypermorphes à l'origine d'une altération quantitative) (Figure 3f) ou en lui conférant une nouvelle activité (allèles néomorphes responsables d'une altération qualitative) (Figure 3g) (67). Les allèles hypermorphes sont

rarement à l'origine de pathologies héréditaires, un des exemples les mieux connus correspond à la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A liée à une duplication génique du gène *PMP22* induisant sa surexpression (70) (Figure 3h). Les allèles néomorphes sont également peu fréquemment impliqués dans la survenue de maladies génétiques (67). Un des exemples les mieux décrits à l'heure actuelle correspond à un déficit particulier en α 1-antitrypsine, un inhibiteur de l'élastase leucocytaire. En effet, le variant Pittsburgh, défini par la mutation faux-sens p.Met358Arg, est responsable d'une perte des propriétés anti-élastase de l' α 1-antitrypsine au profit de l'inhibition des facteurs de coagulation de type sérine protéase tels que la thrombine (71). En conséquence, les patients porteurs de ce génotype présentent un syndrome hémorragique (72).

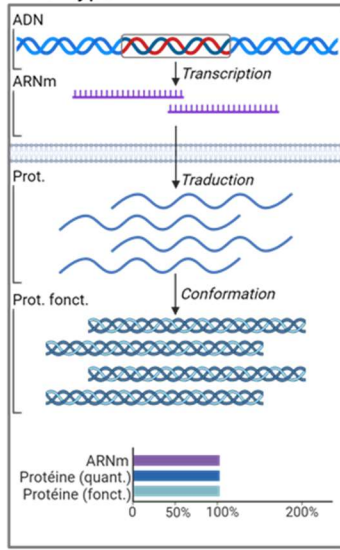
m. Autres situations

Certaines mutations peuvent avoir différents effets (gain ou perte de fonction) en fonction notamment du type cellulaire où le gène muté s'exprime. Par exemple, des mutations faux sens du gène *RET*, un récepteur membranaire impliqué dans les phénomènes de prolifération, différenciation et migration cellulaire, peuvent induire une hyperactivation de ce récepteur et donc un effet de type gain de fonction au niveau des cellules médullaires de la thyroïde alors que dans certaines cellules nerveuses, ces mêmes mutations ont un effet de type perte de fonction et sont responsables d'une anomalie de l'innervation de l'intestin distal (73). Ainsi, les patients porteurs d'une mutation du gène *RET* peuvent dans certains cas être atteints à la fois d'une maladie de Hirschsprung, une malformation du tube digestif, et d'un cancer médullaire de la thyroïde (74). De plus, la présence simultanée de deux mutations délétères au niveau d'un allèle peut dans certains cas avoir des conséquences plus importantes sur la fonction du gène que la présence isolée de l'une ou l'autre de ces mutations. Par exemple, le variant allélique Antilles de la β -globine, défini par la présence des mutations faux-sens p.Glu6Val et p.Val23Ile, est associée à la drépanocytose à l'état hétérozygote alors que le variant porteur uniquement de la mutation p.Glu6Val n'est associée à la maladie qu'à l'état homozygote (75).

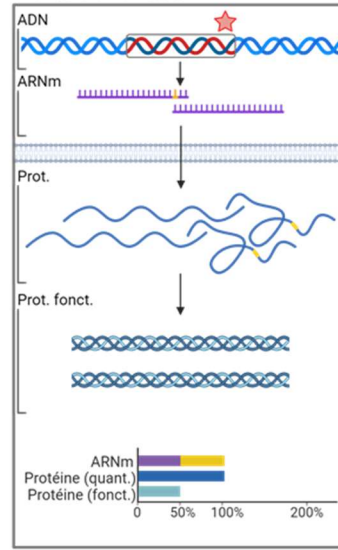
n. Conséquences des mutations délétères sur l'expression du gène

Les mutations peuvent dans de nombreux cas affecter les séquences nucléotidiques impliquées dans la régulation de l'expression d'un gène en altérant sa transcription, sa maturation ou encore sa stabilité.

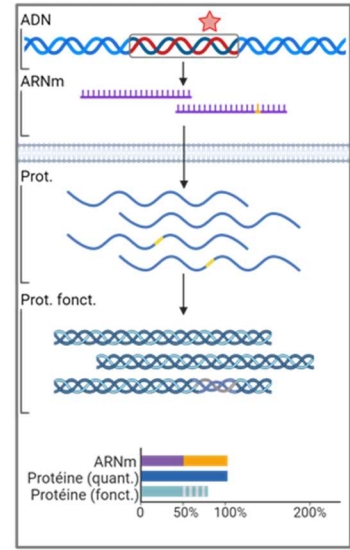
a. Wild-Type



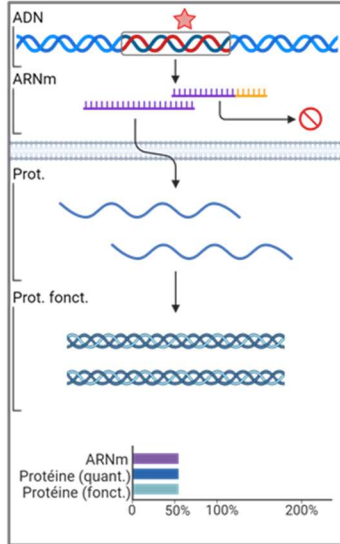
b. Perte de fonction



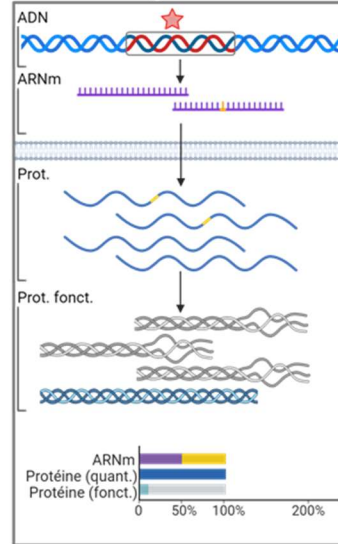
c. Perte de fonction



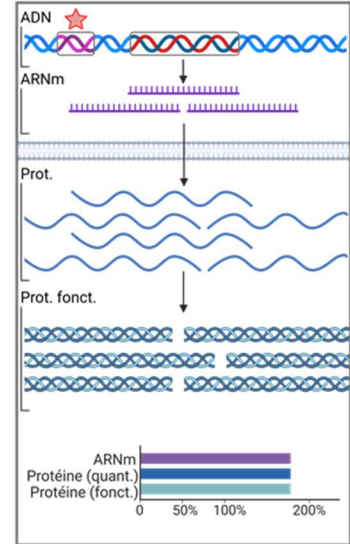
d. Perte de fonction + NMD



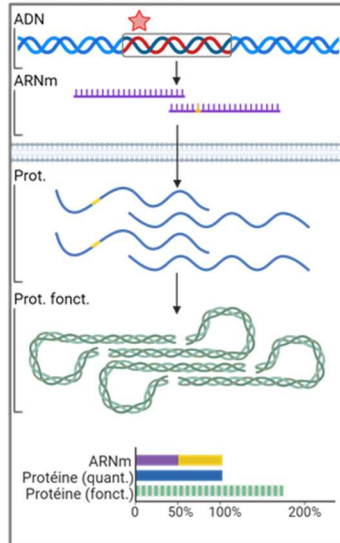
e. Dominant négatif



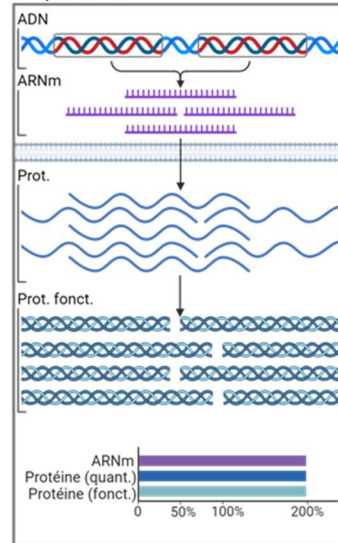
f. Gain de fonction



g. Gain de fonction



h. Duplication



Légende

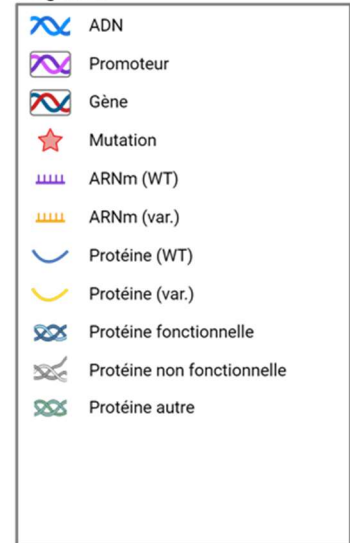


Figure 3 : Différents impacts d'une mutation sur l'expression d'un gène.

En fonction du type d'anomalie et de sa localisation, ses conséquences pourront affecter les étapes de transcription, de traduction ou de conformation, modifier la quantité d'ARNm et de protéine synthétisés ou être à l'origine d'une protéine non fonctionnelle. L'histogramme représente la quantité relative d'ARNm, de protéine synthétisée et de protéine fonctionnelle avec pour référence le génotype wild-type (non muté) correspondant à une expression relative de 100% (a). Un variant sera responsable d'un allèle amorphe en cas de perte de fonction totale (b) ou hypomorphe pour une perte de fonction partielle(c). Un variant générant un ARNm non conforme entrainera son élimination par un mécanisme de NMD (d). Un allèle antimorphe correspond à la présence d'un variant avec un effet dominant négatif responsable de la synthèse d'une protéine anormale inhibant les fonctions physiologiques d'autres protéines (e). Un variant au niveau d'un site promoteur (ou d'un enhancer) peut favoriser l'activité transcriptionnelle conduisant à une surproduction d'ARNm et de protéine (f). Un variant peut être à l'origine d'une protéine fonctionnelle mais différente de la protéine physiologique (g). La duplication d'un gène sera responsable d'une surexpression et d'une synthèse protéique augmentée (h).
fonct. : fonctionnelle ; NMD : non-mediated decay ; prot. : protéine ; var : variant ; WT : Wild-type.

i. MUTATIONS AFFECTANT LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Certaines mutations délétères, en particulier celles localisées dans les séquences promotrices d'un gène, peuvent influencer son expression (76). On distingue en effet deux mécanismes distincts : d'une part, les mutations à l'origine d'une altération d'un site consensus de liaison d'un ou plusieurs facteurs de transcription (Figure 4b) et, d'autre part, celles qui, en modifiant la structure tridimensionnelle de la région promotrice, modulent la fixation des protéines régulatrices (Figure 4c-d) (76). D'autres mutations peuvent altérer des séquences nucléotidiques également impliquées dans la régulation de l'expression génique mais localisées en dehors de la région promotrice, le plus souvent en 5' ou 3' du gène (77). Ces séquences régulatrices, généralement de taille réduite et dénommées « silencers » ou « enhancers », sont notamment impliquées dans la modulation de l'efficacité transcriptionnelle en se liant de manière réversible à diverses protéines régulatrices, souvent tissu-spécifiques, et en participant à l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle (Figure 4e) (78). Enfin, dans certains cas, l'expression d'un gène peut être altérée par une modification de son environnement le plus souvent en réponse à des remaniements chromosomiques tels que des translocations, des délétions, des insertions ou encore des inversions (79,80). En effet, ces réarrangements peuvent être à l'origine d'un effet dit de position et ainsi influencer l'expression d'un gène, soit en le séparant d'éléments régulateurs de type « enhancer » ou « silencer », ou soit à l'inverse en le positionnant à proximité d'une région « enhancer » ou « silencer » d'un autre gène (Figure 4f) (80). Enfin, un dernier exemple d'effet de position, correspond à la juxtaposition d'un gène avec une région d'hétérochromatine, un état transcriptionnellement inactif de la chromatine, et peut ainsi conduire à la perte de son expression (80).

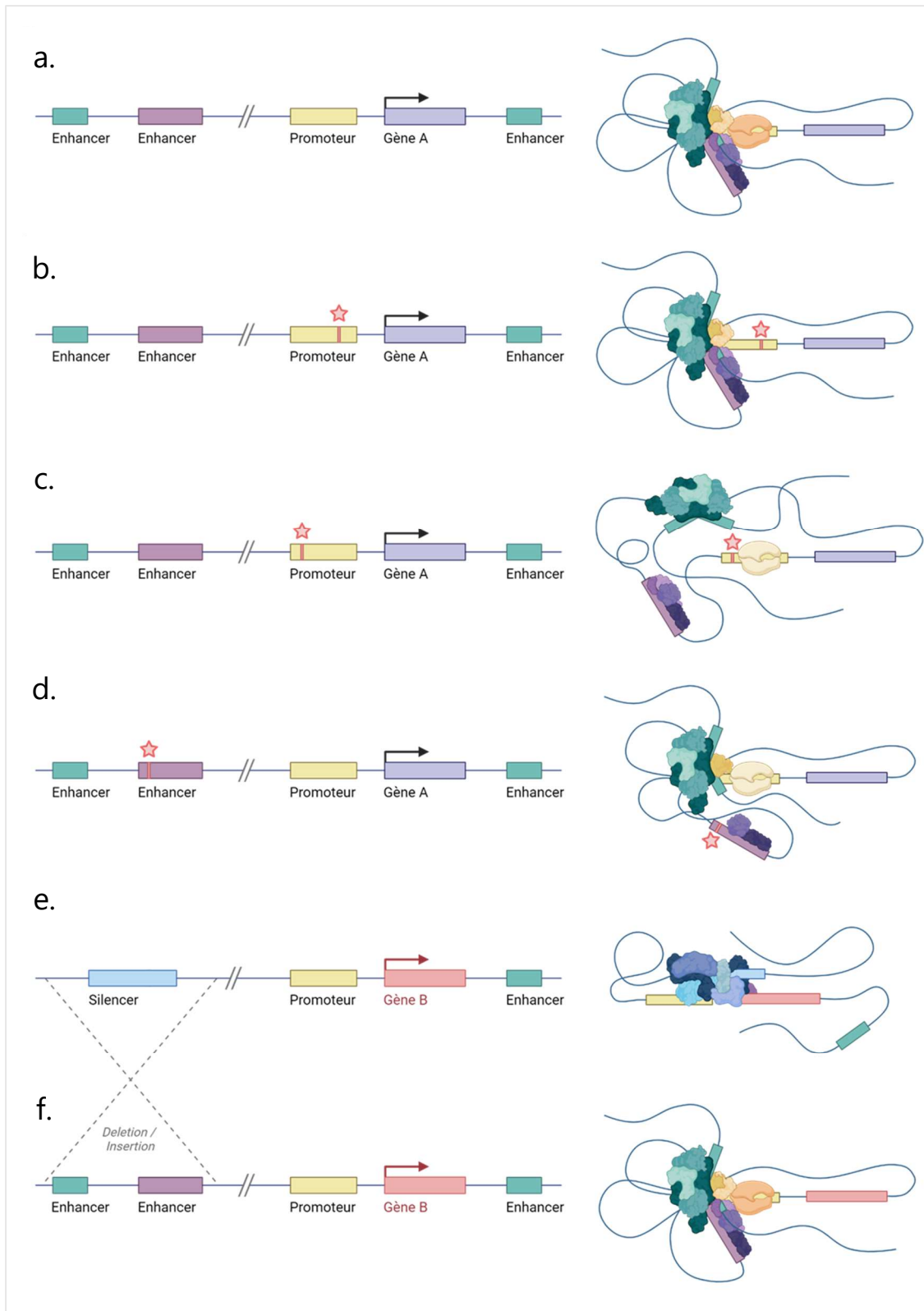


Figure 4 : Différentes anomalies modifiant la transcription d'un gène. Cas de référence, où la fixation de protéines sur des « enhancer » favorise la fixation de facteurs de transcription au niveau du promoteur (a). La présence d'un variant au niveau du promoteur, au niveau du site de fixation du facteur de transcription peut entraîner une inhibition totale de sa fixation (b) ou partielle (c). L'activité des enhancers peut également être réduite par la présence d'un variant, diminuant alors l'activité des facteurs de transcription (d). Action d'un « silencer » empêchant la fixation des facteurs de transcription au niveau du promoteur du gène B non exprimé physiologiquement (e). Anomalie de structure, à l'origine de la délétion du « silencer » et de l'insertion de la région comportant un enhancer, conduisant à l'expression anormale du gène B (f).

ii. INHIBITION DE L'EXPRESSION D'UN GENE PAR UN ARN ANTISENS

Au cours des deux dernières décennies, des avancées significatives dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis d'identifier un grand nombre de transcrits « antisens » pour de nombreux gènes chez les mammifères (81). Cependant, leur rôle dans le contrôle de l'expression des gènes « sens » auxquels ils sont associés ainsi que leur importance en pathologie restent encore mal compris à l'heure actuelle. Une étude a néanmoins montré le rôle délétère exercé par un transcrit antisens dans l' α -thalassémie associée à une délétion du chromosome 16 et affectant le « cluster » *HBA1*, *HBQ1* et *HBA2*, codant respectivement les sous-unités $\alpha 1$, θ et $\alpha 2$ de la globine (82). Cette anomalie génétique est en effet responsable de la perte des gènes *HBA1* et *HBQ1* et de la juxtaposition du gène *HBA2* en aval du gène *LUC7L* dont l'expression est forte et ubiquitaire (82). Ce réarrangement induit la formation du transcrit de fusion *LUC7L/HBA2* antisens pour l'ARN *HBA2* et en conséquence est responsable de la perte d'expression du gène *HBA2* (82).

iii. ANOMALIES DE REGULATION EN TRANS

Des mutations affectant les gènes codant des facteurs de transcription peuvent induire des variations au niveau de la transcription de leurs gènes cibles (83). Bien que ce type d'anomalie soit généralement létal, des mutations du gène *MECP2*, codant une protéine régulant la transcription, sont associées au syndrome de Rett, un désordre neurologique sévère lié à l'X (84). En effet, la protéine MecP2 exerce généralement un rôle de répresseur transcriptionnel en se fixant spécifiquement aux îlots CpG méthylés des promoteurs de nombreux gènes cibles et son inactivation est responsable de la perte de son effet répresseur et de la survenue du syndrome de Rett (84).

iv. ALTERATION DE LA MATURATION DE L'ARN

Chez l'homme, la transcription des gènes en ARN commence par la synthèse d'un pré-ARN non fonctionnel contenant des séquences non codantes d'origine intronique (85). Ce pré-ARN subit ensuite une étape de maturation nucléaire, l'épissage, catalysée par un complexe ribonucléoprotéique, le splicéosome, qui consiste à éliminer les séquences nucléotidiques d'origine intronique afin d'établir une continuité entre deux exons consécutifs et ainsi former l'ARN mature (85). De plus, plusieurs déterminants de séquence tels que les sites donneurs et accepteurs introniques, le site de polypyrimidines vers l'extrémité 3' de l'intron ou encore le point de branchement sont reconnus par le splicéosome et sont nécessaires au processus d'épissage (86). Enfin, des séquences inhibitrices ou activatrices ont la capacité de moduler le processus d'épissage en interagissant respectivement avec les protéines hnRNP et certaines protéines riches en sérine et en arginine, les protéines SR (87). En effet, les hnRNP se fixent généralement sur les séquences inhibitrices exoniques ESS (exonic splicing silencer)

ou introniques ISS (intronic splicing silencer) altérant ainsi la reconnaissance d'un site d'épissage en le masquant, alors que les protéines SR, quant à elles, favorisent la reconnaissance des sites d'épissage en se liant sur les séquences activatrices exoniques ESE (exonic splicing enhancer) ou introniques ISE (intronic splicing enhancer) (87). Le processus d'épissage est donc un processus biologique complexe qui dépend non seulement des constituants ribonucléoprotéiques composant le splicéosome, mais également de protéines régulatrices telles que les protéines hnRNP et les protéines SR. De ce fait, de nombreuses mutations affectant de manière directe ou indirecte l'épissage ont été décrites chez des patients atteints de maladies rares, certaines études estimant même qu'elles représenteraient 15% à 35% des mutations connues (60,88). On distingue en particulier les mutations agissant en *cis*, pouvant notamment affecter un site accepteur ou donneur intronique, altérer la composition nucléotidique d'un point de branchement ou d'une région riche en pyrimidines ou encore favoriser la reconnaissance d'un site cryptique, des mutations agissant en *trans*, qui impactent les constituants du splicéosome ou les protéines jouant un rôle dans la régulation de l'épissage (89).

V. ALTERATION DE LA STABILITE DE L'ARNM

La dégradation des ARNm est un mécanisme moléculaire fondamental qui conditionne la quantité de protéine synthétisée et fait intervenir deux mécanismes biologiques distincts : la dégradation des ARNm non-sens ou NMD et la dégradation constitutive des ARNm ou NSD (90). Le NMD est impliqué dans la dégradation spécifique des ARNm portant un codon stop prématuré situé à plus de 50 nucléotides en amont d'une jonction exon/exon, évitant ainsi la biosynthèse d'une protéine tronquée généralement non fonctionnelle voire potentiellement délétère par un effet dominant négatif. L'importance de ce mécanisme en pathologie a notamment été démontrée dans les neurocristopathies associées à des mutations tronquantes du facteur de transcription SOX10 (91). En effet, les mutations non-sens situées dans l'exon terminal du gène *SOX10* échappent au mécanisme NMD et sont associées à un phénotype sévère en raison de la synthèse en grande quantité d'une protéine anormale exerçant un effet dominant négatif, alors que celles situées au sein des exons internes induisent une neurocristopathie modérée de par la mise en jeu du mécanisme NMD et la production en quantité réduite de la protéine anormale (91).

II. LA NEPHRONOPHTISE

1. Le cil primaire

Les cils cellulaires sont des organelles formées de microtubules ressortant de la cellule, classiquement, séparés en deux catégories distinctes : les cils mobiles et les cils primaires (92).

Les cils mobiles sont présents chez l'homme uniquement dans certains types cellulaires et le plus souvent en grand nombre (93). Ce type de cil, grâce à un mouvement synchrone permet de générer un mouvement (94,95). Par exemple, dans les cellules épithéliales trachéales, ils permettent d'évacuer le mucus et les particules des voies respiratoire. De même, ils favorisent la circulation du liquide cébrospinal ou participent au transport de l'ovule dans l'oviducte (96,97).

Le cil primaire, immobile, est présent au niveau du pôle apical de la plupart des cellules et est toujours retrouvé de manière isolée (92). Il agit principalement comme un « senseur » en captant des signaux extracellulaires physiques (lumière, flux, ...) ou biochimiques (ligands, ...) afin de réguler ou mettre en place plusieurs mécanismes cellulaires nécessaires à l'homéostasie ou au développement embryonnaire (98–101). Il se caractérise, d'une part, par la structure de son axonème, composé de neuf doublets de microtubules périphériques, et, d'autre part, par la nature de son corps basal (Figure 5)(102,103).

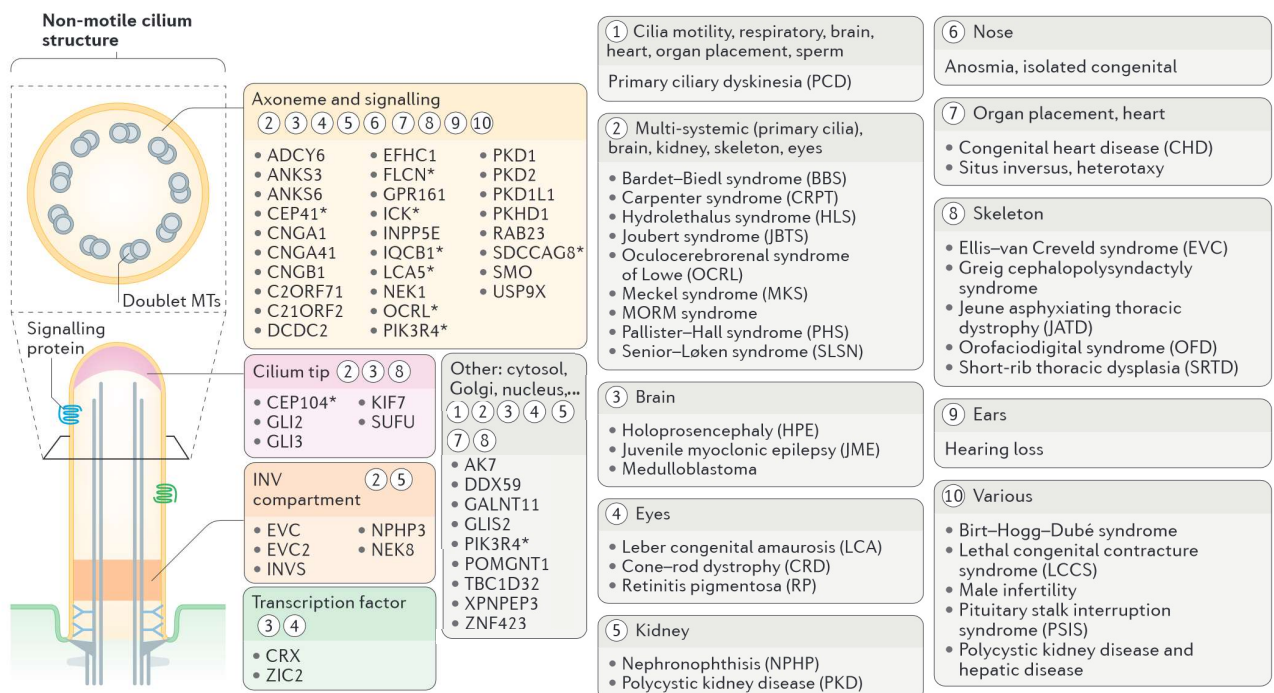


Figure 5 : Gènes impliqués dans la structure du cil primaire responsable de pathologies. D'après Reiter et al, 2017 (104).

a. Structure et fonctions du cil primaire

i. ASPECTS STRUCTURELS

Malgré leur grande diversité, cils et flagelles partagent une structure similaire constituée de trois grands compartiments : le corps basal d'origine centriolaire et jouant le rôle de centre nucléateur de l'axonème, la zone de transition impliquée dans le contrôle du contenu protéique ciliaire et l'axonème, une structure microtubulaire généralement constituée de neuf doublets de microtubules (105). L'axonème et la zone de transition sont entourés d'une membrane ciliaire continue avec la membrane plasmique et les cils sont le plus souvent partiellement internalisés comme le montre la Figure 6.

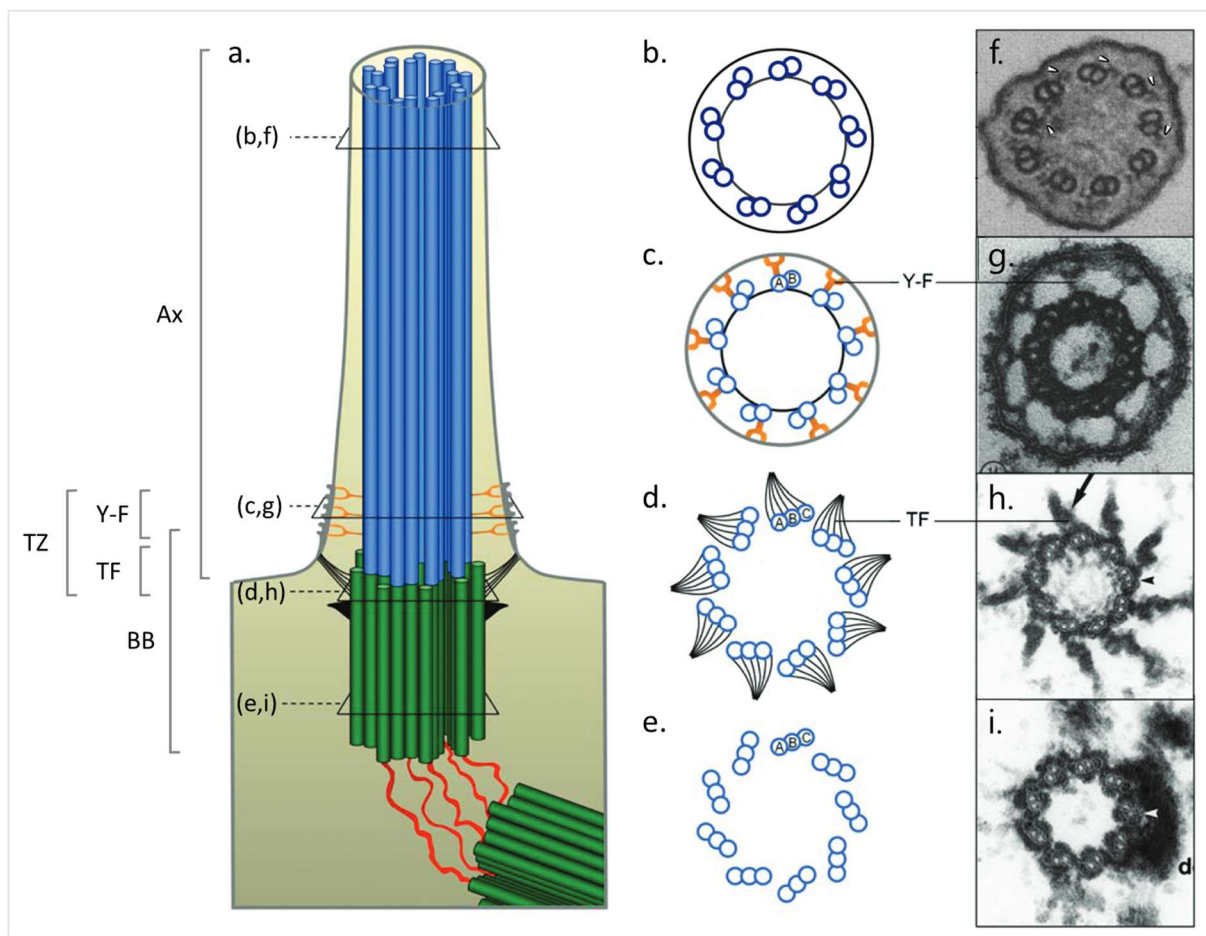


Figure 6 : Structure d'un cil primaire.

Vue longitudinale schématisée d'un cil primaire (a). Représentation schématisée (b,c,d,e) et image issue de microscopie électronique (f,g,h,i) d'une coupe transversale du cil primaire pour chacune de ses sections. L'axonème est composé de 9 paires de microtubules (b,f), avec au niveau basal la présence de fibres en Y (c,g). Le corps basal se compose de 9 triplets de microtubules (e,i), avec en plus dans sa partie supérieure les fibres de transitions qui permettent l'ancrage à la membrane cellulaire (d,h).

Ax : axonème, BB : corps basal, TF : fibres de transition, Y-F : fibres en Y, TZ : zone de transition.

Adapté de Molla-Hermann et al. 2010 (102) et Takeda et al. (103).

ii. ASPECTS FONCTIONNELS

Autrefois considéré comme un organite vestigial sans fonction importante, il est maintenant bien établi que le cil primaire est en fait une organelle cruciale impliquée dans un large éventail de fonctions cellulaires (106). En effet, le cil primaire joue le rôle d'antenne sensorielle permettant, d'une part, la détection des changements dans l'environnement extracellulaire tels que des signaux mécaniques, comme le flux urinaire dans le rein, ou des signaux biochimiques, sous forme de messagers moléculaires et, d'autre part, le relai de ces informations à la cellule par des voies de signalisation spécifiques (107,108). Ainsi, le cil primaire est un organe sensoriel majeur nécessaire au développement embryonnaire et à la fonction de nombreux organes en orchestrant la réception de nombreux stimuli tels que les variations de température, la lumière ou encore des messagers chimiques et ses dysfonctionnements sont à l'origine d'atteintes multisystémiques graves avec de nombreux phénotypes différents tels qu'une dégénérescence rétinienne, des malformations ou encore des atteintes rénales ou hépatiques (109,110).

Mécanosenseur. Le cil primaire joue le rôle de mécanosenseur en détectant les stimuli mécaniques tels que l'écoulement d'un fluide biologique, la contrainte de cisaillement ou encore la déformation tissulaire (111–113). Par exemple, au niveau des cellules épithéliales rénales, le cil est présent à la surface du pôle apical dans la lumière tubulaire où il subit les contraintes mécaniques induites par le flux urinaire (114–116). Ainsi, une augmentation des forces mécaniques exercées lors de l'écoulement urinaire se traduit par une élévation de la concentration intracellulaire de calcium suite à l'activation d'un canal calcique hétérodimérique localisé sur le cil et constitué des protéines polycystine-1 (PC1) et polycystine-2 (PC2) (111,117,118). Ce signal calcique active ensuite plusieurs voies de signalisation, telles que celles médiées par mTOR, impliquées dans la régulation du débit urinaire ou encore la prolifération et la taille des cellules tubulaires (115,119). Enfin, le cil primaire pourrait être également impliqué au niveau de la *macula densa* dans le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire, un mécanisme physiologique permettant le couplage entre la fonction tubulaire et l'hémodynamique rénale (120,121).

Chémosenseur. Outre ses propriétés de mécanotransduction, le cil primaire est également impliqué dans la détection de nombreux signaux biochimiques (122). En effet, la membrane du cil primaire se caractérise par une densité élevée de récepteurs transmembranaires et de canaux ioniques (123,124) permettant la transmission à la cellule de nombreuses informations distinctes sur son environnement extracellulaire (125–127). Par exemple, le cil primaire joue un rôle essentiel dans les étapes de la morphogenèse cérébrale, notamment *via* son rôle dans la perception et la transduction du signal Hedgehog par l'intermédiaire du récepteur transmembranaire Patched1 en induisant l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles (128).

b. Mécanismes et régulation de la ciliogenèse

i. LA CILIOGENESE

Le cil primaire ayant une importance capitale pour l'homéostasie cellulaire, ses dysfonctionnements sont à l'origine de plusieurs maladies multisystémiques, regroupées sous le terme de ciliopathies, et résultent le plus souvent d'un défaut dans le processus de ciliogenèse (104). La formation du cil primaire débute lorsque les cellules sont quiescentes et résulte d'une succession d'étapes cytoplasmiques coordonnées dans le temps et dans l'espace aboutissant à l'ancrage du corps basal aux membranes cellulaires (73,74). De plus, le processus de ciliogenèse repose sur des mécanismes très conservés au cours de l'évolution faisant intervenir un grand nombre d'acteurs moléculaires.

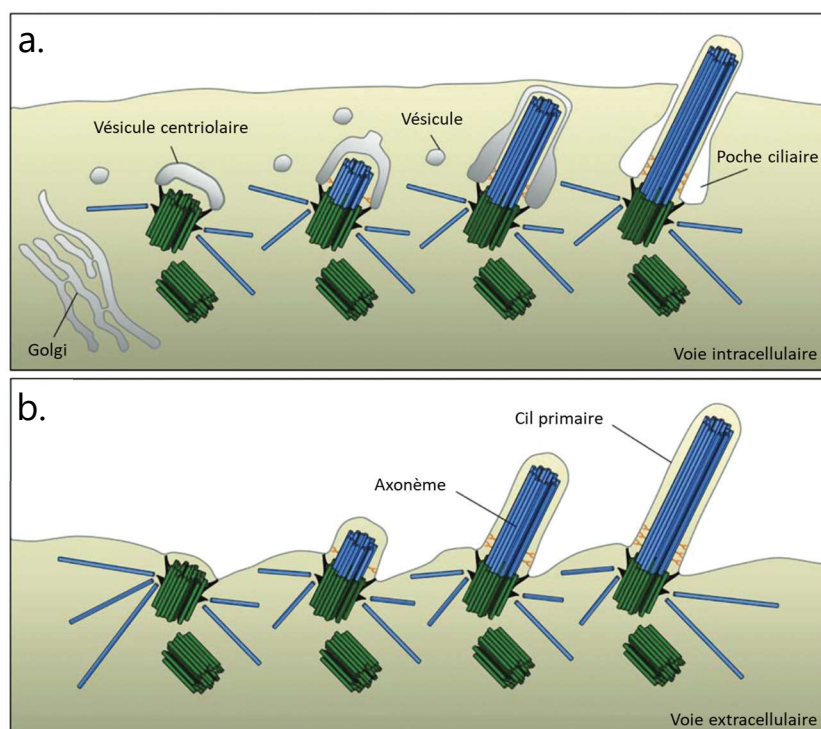


Figure 7 : Voies intracellulaire et extracellulaire de la ciliogenèse.

La voie intracellulaire (a) implique la fixation de la vésicule centriolaire au niveau du corps basal qui englobe l'axonème lors de son élongation jusqu'à sa fusion avec la membrane plasmique, formant ainsi la poche ciliaire. Lors de la voie extracellulaire (b) le corps basal se fixe à la membrane plasmique et l'axonème s'allonge directement à l'extérieur de la cellule, ne nécessitant pas de vésicule et ne formant pas de poche ciliaire (D'après Pedersen et al., 2012) (129)

Chez les mammifères, les différentes étapes impliquées dans la formation des cils ont été initialement rapportées par Sorokin en 1968 et deux voies principales ont été identifiées en fonction de la nature des cellules (130). En effet, dans la plupart des cellules, comme les fibroblastes ou les cellules musculaires, la formation du cil primaire a lieu au niveau cytoplasmique (voie intracellulaire) suite à l'association d'un des deux centrioles du centrosome à une vésicule cytoplasmique par son extrémité distale (131,132). L'axonème ainsi formé dans cette vésicule croît par fusion membranaire avec d'autres structures

vésiculaires puis le cil primaire ainsi préassemblé est libéré à la surface de la cellule par fusion de la vésicule ciliaire avec la membrane plasmique (132). D'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales ne font pas intervenir d'intermédiaires vésiculaires (voie extracellulaire), et l'assemblage du cil à la surface cellulaire résulte dans ce cas de l'ancrage direct d'un des deux centrioles à la membrane apicale (133).

ii. REGULATION DE LA CILIOGENESE

La régulation du processus de ciliogenèse fait intervenir de nombreuses voies de signalisation intrinsèquement liées les unes avec les autres, en particulier celles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, l'organisation du cytosquelette d'actine ou encore certaines voies métaboliques.

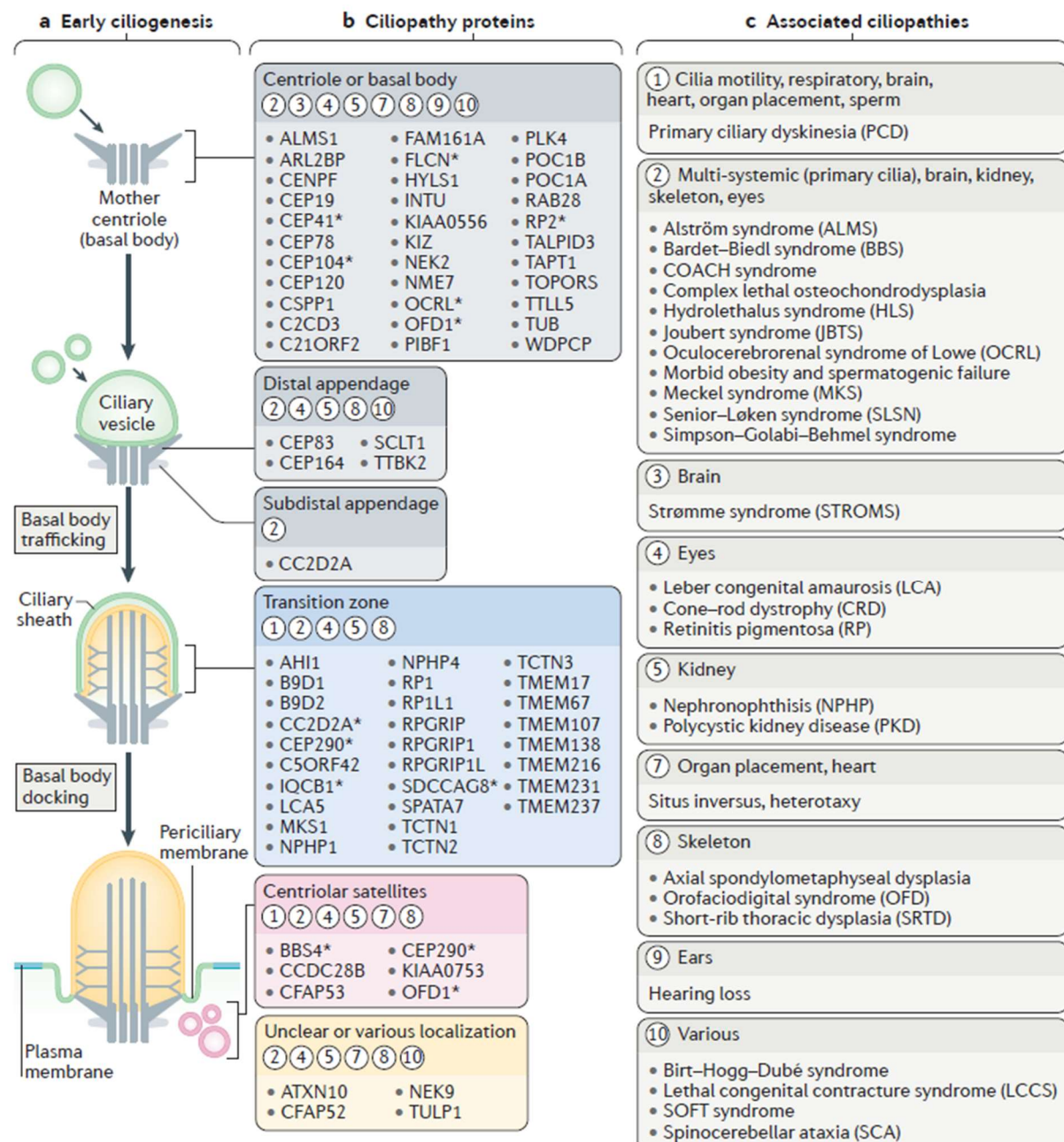


Figure 8 : Gènes impliqués dans la ciliogenèse et leurs pathologies associées.

Étapes de la ciliogenèse à partir du centriole mère où se fixe une vésicule ciliaire jusqu'à l'ancrage du corps basal aux membranes cellulaires (a). De nombreux gènes sont impliqués dans le processus de ciliogenèse (b). En cas d'anomalies génétiques, le phénotype retrouvé peut atteindre un ou plusieurs organes et être associé à différentes pathologies ou syndromes (c).

D'après Reiter et al, 2017 (104).

iii. RÔLE DU CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire joue un rôle important dans le contrôle du processus de ciliogenèse en régulant l'expression de plusieurs acteurs moléculaires intervenant dans la formation du cil primaire (134). Par exemple, la protéine kinase TTBK2 dont l'expression varie au cours du cycle cellulaire exerce un rôle important dans l'initiation et la progression de la ciliogenèse (135,136). De même, la protéine kinase CDK5, un des régulateurs majeurs du cycle cellulaire, est exprimée dans les cellules quiescentes et régule par phosphorylation l'activité de NDE1, une protéine impliquée dans l'inhibition du processus de ciliogenèse. Ainsi, comme le montre la Figure 9, la présence du cil primaire à la surface cellulaire est conditionnée par la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule (137–139). En effet, le cil se forme durant la phase de quiescence du cycle cellulaire puis disparaît progressivement à partir de la transition G1/S du cycle cellulaire.

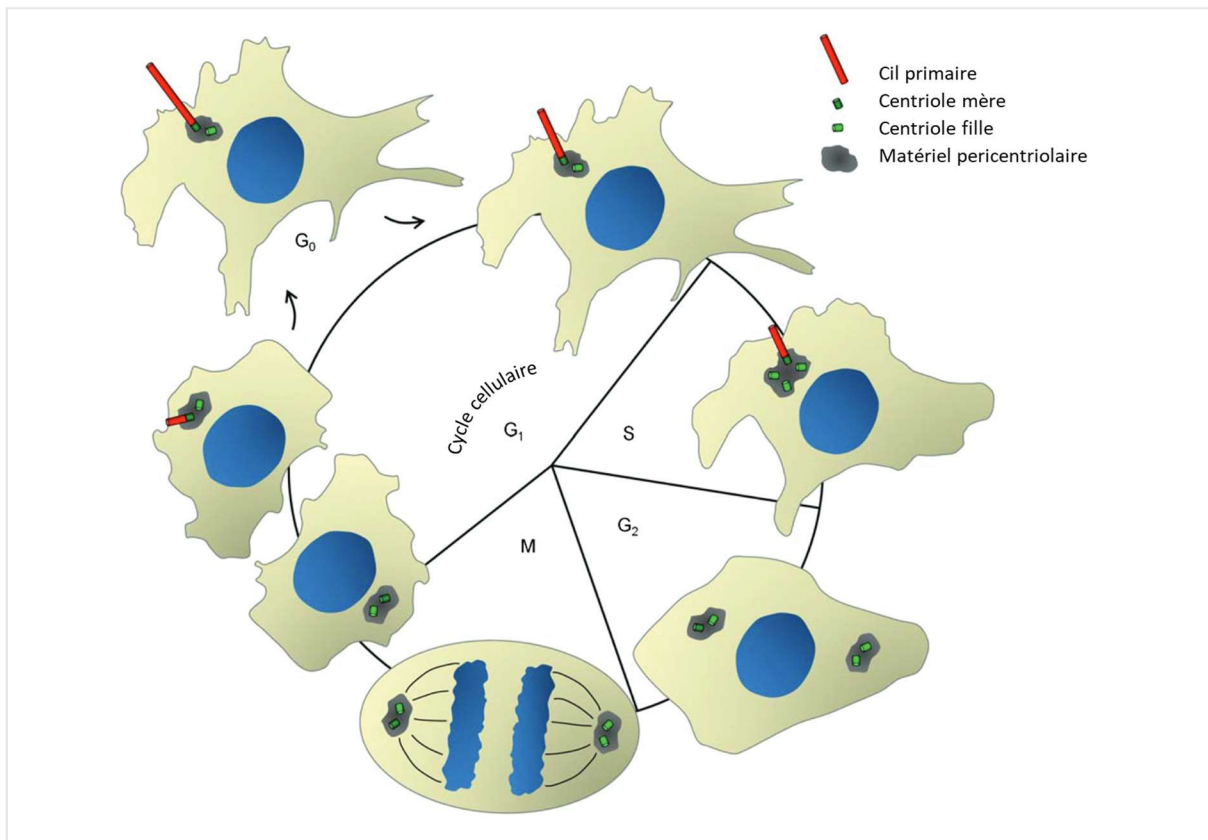


Figure 9 : Le cil primaire au cours du cycle cellulaire.

Adapté de Pedersen et al., 2012 (129)

iv. ROLE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE

Le cytosquelette d'actine joue également un rôle important dans le contrôle du processus de ciliogenèse en permettant notamment la migration et l'ancrage du corps basal à la membrane (140,141) ou en régulant la longueur du cil (142). Par exemple, l'exposition des cellules à un agent dépolymérisant les filaments d'actine comme la cytochalasine D est capable d'induire une augmentation de la longueur du cil (143–145). De même, certaines protéines nucléaires comme les nesprines et les lamines sont essentielles au processus de ciliogenèse en interagissant avec le cytosquelette d'actine (146,147).

v. ROLE DE L'AMP CYCLIQUE (AMPC)

L'AMPC est un second messager impliqué dans de très nombreux processus biologiques tels que la signalisation hormonale via l'activation de la protéine kinase A ou certains canaux calciques (148,149). Le taux d'AMPC intracellulaire joue également un rôle important dans la régulation du processus de ciliogenèse. L'activation de la protéine kinase A est en effet corrélée à une augmentation de la longueur du cil (148,150) en modulant, d'une part, la dynamique du cytosquelette d'actine et en régulant, d'autre part, l'activité de plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Par exemple, l'activation de la protéine kinase A induit notamment une augmentation de l'expression de CDKN1B, une protéine régulatrice du cycle cellulaire impliquée dans la transition G1/S (151).

2. La néphronophtise

La néphronophtise (NPH), décrite par Fanconi en 1951 (152), fait partie des néphropathies héréditaires tubulo-interstitielles chroniques de transmission autosomique récessive se caractérisant par des lésions des membranes basales tubulaires ainsi que par la survenue de kystes au niveau de la jonction cortico-médullaire et évoluant vers l'IRCT (153). La NPH est en effet une cause majeure d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant ou le jeune adulte. Trois formes cliniques sont actuellement définies : la NPH infantile (âge moyen d'apparition de l'IRCT avant 3 ans), la NPH juvénile (âge moyen d'apparition de l'IRCT vers 13 ans), la plus fréquente, et la NPH de l'adolescent ou du jeune adulte avec une IRCT en moyenne à 19 ans. Néanmoins, plusieurs cas de NPH avec une IRCT de révélation tardive ont été décrits chez des adultes de plus de 62 ans. Enfin, la NPH a récemment été classée dans le groupe des « ciliopathies » (154,155), qui regroupent l'ensemble des pathologies héréditaires associées à un dysfonctionnement des gènes codant pour des protéines impliquées dans la fonction des cils primaires et motiles (104).

Tableau 3 : Localisations et alias des gènes responsables de ciliopathies
D'après YH Youn et al, 2018 (156).

Complexes	Gènes	Alias
IFT-A	WDR19 (IFT144)	ATD5, CED4, NPHP13 , SRTD5
	IFT140	MZSDS, SRTD9
	IFT122	CED1, WDR10, WDR10p, WDR140
	TTC21B (IFT139)	ATD4, THM1, SRTD4, JBTS11, NPHP12
	WDR35 (IFT121)	CED2, IFTA1, SRTD7
	IFT43	CED3
IFT-B	IFT172	SLB, Wim, RP71, BBS20, NPHP17 , SRTD10
	IFT88	TG737
	IFT81	DV1, CDV1, CDV1R
	IFT80	ATD2, SRTD2, WDR56
	IFT74	CMG1, BBS20, CCDC2
	IFT57	HIPPI, MHS4R2, ESRRBL1
	TTC30B (IFT70)	Fleer, IFT70B
	TTC26 (IFT56)	
	TRAF3IP1 (IFT54)	MIPT3, SLSN9
	IFT52	NGD2, NGD5, CGI-53
	IFT46	CFAP32, C11orf2, C11orf60
	CLUAP1 (IFT38)	
	HSPB11 (IFT25)	
	IFT27	RAYL, BBS19, RABL4
	IFT22	RABL5
	IFT20	
Kinesin motor II	KIF3A	FLA10, KLP-20
	KIF3B	FLA8, HH0048, KLP-11
	KIFAP3	FLA3, KAP3, SMAP, KAP-1
Cytoplasmic dynein II	WDR34	DIC5, FAP133, SRTD11, bA216B9.3
	WDR60	SRPS6, SRTD8, FAP163
	TCTEX1D2	
	NUDCD3	NudCL
	DYNC2LI1 (LIC3)	LIC3, D2LIC
Zone de transition Module NPHP	NPHP1	NPH1, JBTS4, SLSN1
	INVS	INV, NPH2, NPHP2
	NPHP3	MKS7, NPH3, RHPD, RHPD1, CFAP31
	NPHP4	POC10, SLSN4
	IQCB1 (NPHP5)	PIQ, NPHP5 , SLSN5
	RPGRIP1L	FTM, MKS5, CORS3, JBTS7, NPHP8 , PPP1R134
	NEK8	JCK, NPHP9 , RHPD2, NEK12A
	ANKS3	
	ANKS6	PKDR1, SAMD6, NPHP16 , ANKRD14
	ATXN10	E46L, SCA10, HUMEEP

Zone de transition <i>Module MKS</i>	B9D1	MKS9, EPPB9, MKSR1, JBTS27
	B9D2	MKS10, MKSR2, ICIS-1
	MKS1	MES, MKS, BBS13, POC12, JBTS28
	AHI1	JBTS3
	CC2D2A	MKS6, JBTS9
	TCTN1	JBTS13
	TCTN2	MKS8, JBTS24
	TCTN3	OFD4, JBTS18
	KCTD10	BTBD28, ULRO61, MSTP028, hBACURD3
	TMEM237	JBTS14, ALS2CR4
	TMEM231	MKS11, JBTS20, ALYE870, PRO1886
	TMEM218	
	TMEM216	HSPC244
	TMEM138	HSPC196
	TMEM107	GRVS638, PRO1268
	TMEM67	MKS3, JBTS6, NPHP11 , MECKELIN
	TMEM17	
	CEP290	MKS4, POC3, rd16, BBS14, JBTS5, LCA10, NPHP6 , SLSN6
	Fibre de transition	CEP83
CEP89		CEP123, CCDC123
SCLT1		CAP1A, CAP-1A
FBF1		Alb
CEP164		NPHP15
BBSome	BBS1	BBS2L2
	BBS2	BBS, RP74
	BBS4	
	BBS5	
	BBS7	BBS2L1
	TTC8 (BBS8)	RP51
	BBS9	B1, D1, C18, PTHB1
	BBIP1 (BBS18)	BBIP10

a. Aspects cliniques et histologiques

En 1945, Graham et Smith rapportent pour la première fois, sous le terme générique « maladie kystique de la médullaire rénale (MCKD) » (157), un groupe de pathologies génétiques partageant des caractéristiques communes sur le plan néphrologique telles que la présence de kystes médullaires, une fibrose interstitielle et dont l'évolution vers l'IRCT est inéluctable (158). En 1951, Fanconi identifie la NPH comme une pathologie à part entière et trois formes cliniques sont par la suite identifiées : la NPH infantile, la NPH juvénile et la NPH de l'adolescent ou du jeune adulte (152). Bien qu'il s'agisse d'une pathologie rare, la NPH juvénile est la forme la plus commune de la maladie et représente la première cause génétique d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant (158,159).

i. ASPECTS CLINIQUES

Sur le plan clinique, les premiers symptômes de la NPH résultent d'une perte des sels et de l'incapacité du rein à concentrer les urines avec pour conséquences une polyurie, une polydipsie ainsi qu'une énurésie (155). L'étude biochimique et cyto bactériologique des urines montre généralement, outre une hypernatrurie, l'absence d'hématurie microscopique, de protéinurie et d'infection urinaire et la pression artérielle, est habituellement normale (160,161). Le trouble de concentration des urines est généralement confirmé par une osmolalité urinaire basse ainsi que par l'absence d'augmentation de l'osmolalité urinaire après administration de DDAVP, témoignant de l'insensibilité du rein à l'hormone antidiurétique (162,163). Puis, la maladie évolue progressivement vers une insuffisance rénale terminale (154,164,165). L'échographie rénale, bien que pouvant être normale au début de la maladie, montre quant à elle une hyperéchogénicité des reins associés à une perte de la différenciation corticomédullaire (166,167). À un stade tardif, des kystes au niveau de la médullaire sont généralement mis en évidence (101,158,168). Enfin, la NPH peut être isolée ou syndromique avec des atteintes extra-rénales dans 15 à 40% des cas (164,169), en particulier une dystrophie rétinienne avec rétinite pigmentaire ainsi que des troubles neurologiques, osseux et hépatiques ou plus rarement un *situs inversus* (101,164,170–173).

ii. ASPECTS HISTOLOGIQUES

Sur le plan histologique, les lésions affectent essentiellement les structures tubulaires avec à la fois des tubules atrophiés ou dilatés, des anomalies franches des membranes basales tubulaires et une fibrose interstitielle marquée (154,172). À un stade tardif de la maladie, des dilatations kystiques des tubes sont visibles au niveau de la médullaire (Figure 10) (174).

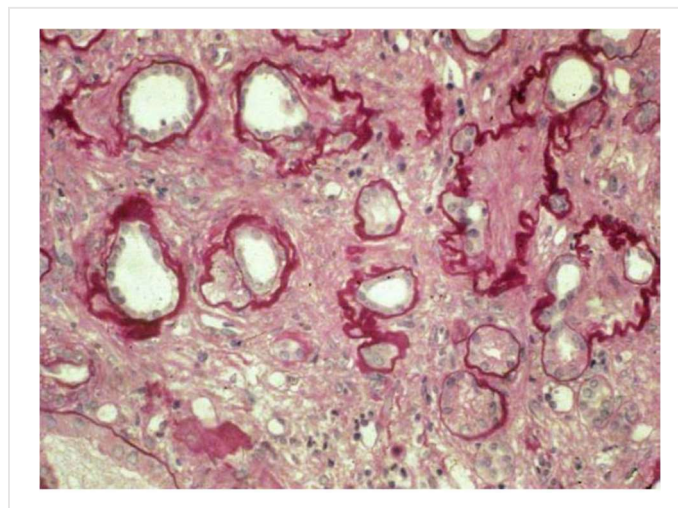


Figure 10 : Aspect histologique de la néphronophtose juvénile. Les membranes basales tubulaires apparaissent en certains points épaissies et en d'autres amincies. Les tubes sont atrophiés. Une fibrose interstitielle se développe (174).

iii. ASPECTS GENETIQUES

La NPH est une néphropathie héréditaire monogénique de transmission autosomique récessive présentant une grande hétérogénéité non seulement clinique mais également génétique (155,175). L'avènement récent des technologies de séquençage à haut débit a en effet permis d'accélérer considérablement ces dix dernières années l'identification des gènes impliqués dans la NPH et les ciliopathies qui lui sont associées avec actuellement 23 gènes reconnus pour être impliqués dans la NPH (176-177). Néanmoins, *NPHP1*, dont le rôle dans la survenue de la NPH date de 1997, demeure le gène majoritairement incriminé chez plus de 20% des patients atteints de NPH (178–180). De nombreuses études ont également établi un lien entre l'hétérogénéité clinique de la NPH et le type de gène altéré ou la nature des mutations incriminées (180,181). Par exemple, certains gènes comme *NPHP1* ou *NPHP4* sont préférentiellement altérés dans les formes juvéniles de NPH alors que d'autres, tels que *NPHP2* ou *NPHP9*, le sont dans les formes infantiles (182). Des altérations du gène *NPHP1* sont davantage associées à des formes isolées (80% des cas), alors que des anomalies des gènes *NPHP2*, *NPHP5* et *NPHP8* sont par exemple préférentiellement retrouvées dans des formes syndromiques de néphronophtise (*situs inversus*, défauts rétiniens et syndromes de Joubert respectivement). De même, la présence d'un allèle hypomorphe est souvent associée à un phénotype moins sévère par rapport à un allèle perte de fonction (183). Par exemple, des mutations faux-sens du gène *NPHP3* sont associées au développement d'une forme juvénile de NPH avec peu d'atteintes extra-rénales, alors que des mutations tronquantes de ce gène induisent une forme syndromique sévère, le syndrome de Meckel (184,185). Un autre exemple concerne le gène *TTC21B*, pour lequel les patients hétérozygotes composites pour les variants p.C552X et p.P209L ont une forme précoce de NPH, alors que les porteurs de la mutation p.P209L à l'état homozygote sont atteints d'une forme de NPH de révélation tardive (186,187). Enfin, certains gènes modificateurs modulant la sévérité de la maladie ont également été mis en évidence (188,189). Ce mécanisme suppose que la présence d'une ou de plusieurs mutations hétérozygotes additionnelles contribuerait à aggraver le phénotype associé à une mutation causale et expliquerait ainsi l'existence de phénotypes différents associés à une même mutation génétique causale (189,190). Un des meilleurs exemples dans le cadre de la NPH concerne l'association d'une mutation hétérozygote au niveau des gènes *NPHP6* ou *AHI1* à des mutations bialléliques du gène *NPHP1* (161). En effet, les patients porteurs de ce génotype sont atteints du syndrome de Joubert avec atteinte neurologique alors que ceux présentant une altération isolée du gène *NPHP1* sont quant à eux atteints uniquement d'une forme de NPH juvénile (191,192).

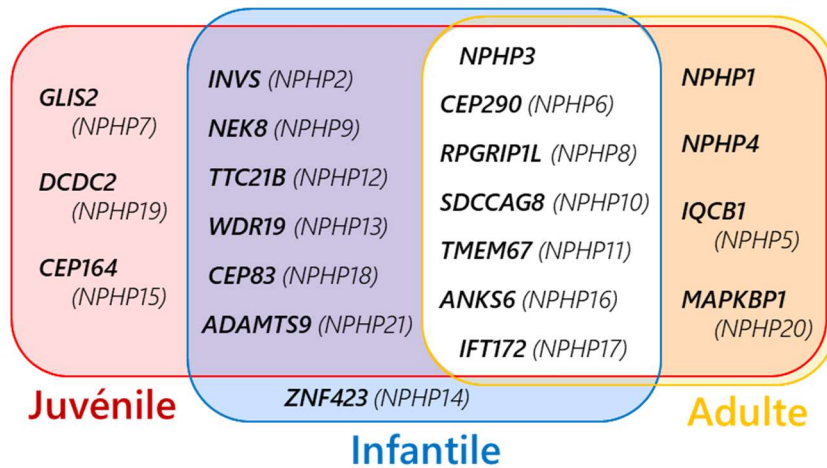


Figure 11 : Gènes impliqués dans les différentes formes de néphronophtise

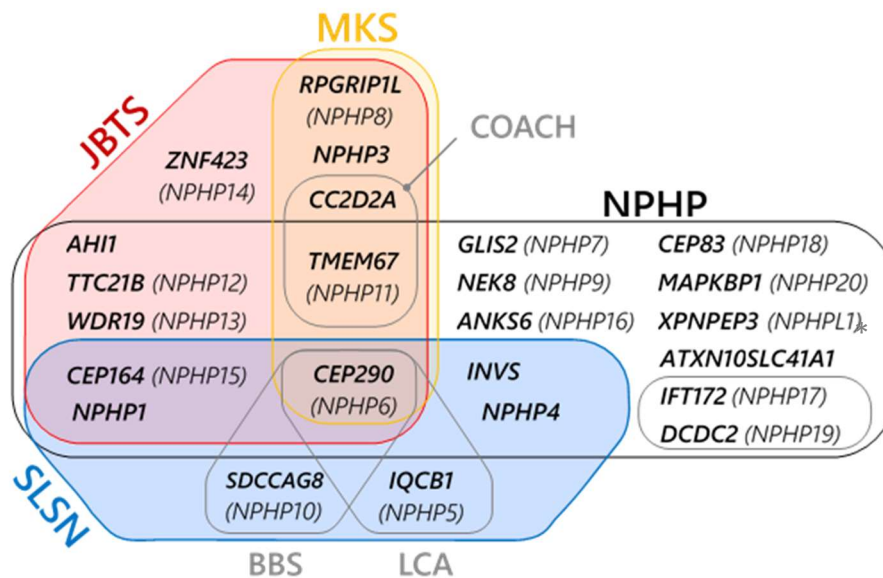


Figure 12 : Gènes de la néphronophtise impliqués dans différentes formes de ciliopathies.

BBS : Sd de Bardet-Biedl, MKS : Sd de Meckel, JBTS : Sd de Joubert, NPHP : Néphronophtise, SLSN : Sd de Senior-Loken, * : other

Une étude de cas d'une néphronophtise familiale causée par la présence de deux variants au niveau du gène *NPHP3* est présentée sous la forme d'un article didactique en Annexe 1 (page 109) du document.

Annexe 1

Diagnostic utility of whole-genome sequencing for nephronophthisis

Larrue R, Chamley P, Bardyn T, Lionet A, Gnemmi V, Cauffiez C, Glowacki F, Pottier N, Broly F.

npj Genomic Medicine (2020) 5:38

III. SYNDROME D'ALPORT

Parmi les autres atteintes primitives responsables de l'apparition d'une maladie rénale chronique, le syndrome d'Alport reste une des causes les plus fréquentes avec une incidence d'environ 1 individu pour 5000 et responsable de 2% des IRCT (193). Décrit initialement en 1902 (194), cette affection héréditaire est caractérisée par des altérations au niveau de la structure du collagène de type IV à l'origine de la présence d'une hématurie progressive évoluant vers l'IRCT et d'anomalies ultra-structurales au niveau de la membrane basale glomérulaire. Dans les formes sévères de la maladie, comme décrit ensuite par AC Alport en 1927, la présence de signes extra-rénaux tels qu'une surdité de perception ou des atteintes oculaires sont également associés à la néphropathie (195).

1. Le collagène de type IV

a. Structure

Le collagène de type IV est le principal constituant biochimique des membranes basales (196,197). Au niveau structural, il s'agit d'un type de collagène non fibrillaire et organisé sous la forme d'un réseau plan (196,198)(Figure 13). Ce collagène est constitué, comme les autres collagènes, de trois chaînes alpha enroulées en hélice parmi six isoformes différentes ($\alpha 1$ à $\alpha 6$) et seuls les hétérotrimères $\alpha 1$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$ (IV), $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 5$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$ (IV) sont retrouvés dans les membranes basales à des niveaux variables selon les tissus (199,200). Par exemple, le trimère $\alpha 1$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$ (IV) est ubiquitaire et également présent dans la membrane basale du glomérule rénal au stade fœtal, alors que le trimère $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ (IV) a une distribution plus restreinte, notamment au niveau des membranes basales du glomérule rénal mature, de l'œil ou encore de l'oreille interne (201).

Au niveau moléculaire les chaînes alpha comportent trois régions distinctes consistant en un domaine C-terminal NC1, un domaine N-terminal 7S, les deux étant séparés par un domaine central comportant de nombreux motifs collagéniques (199,202). L'assemblage des monomères en protomère est réalisé au niveau intracellulaire, et nécessite notamment le domaine NC1 qui sera le point de départ de la formation de la triple hélice (203–205). Les protomères synthétisés sont ensuite exportés au niveau extracellulaire et vont s'associer en un réseau grâce à l'interaction des domaines NC1 et 7S (Figure 13) (198,206).

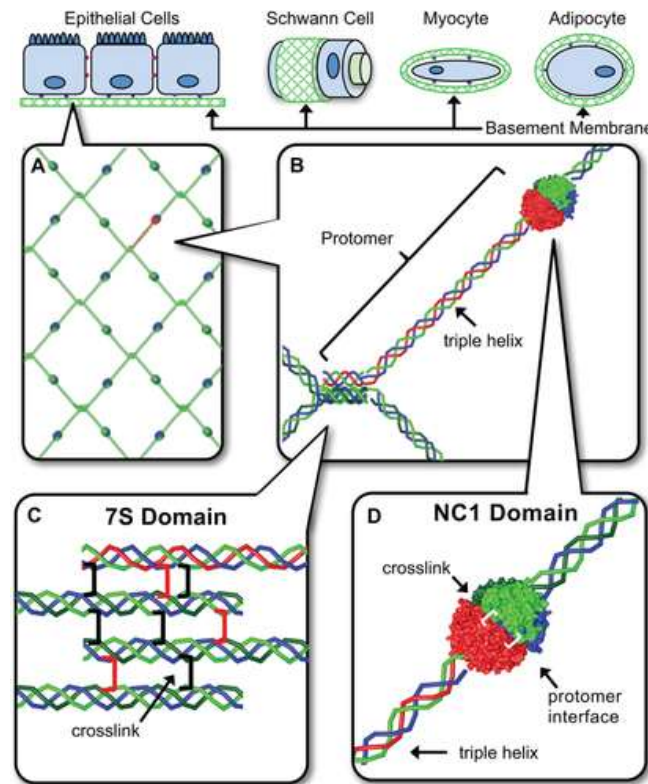


Figure 13 : Organisation du collagène au niveau de la membrane basale

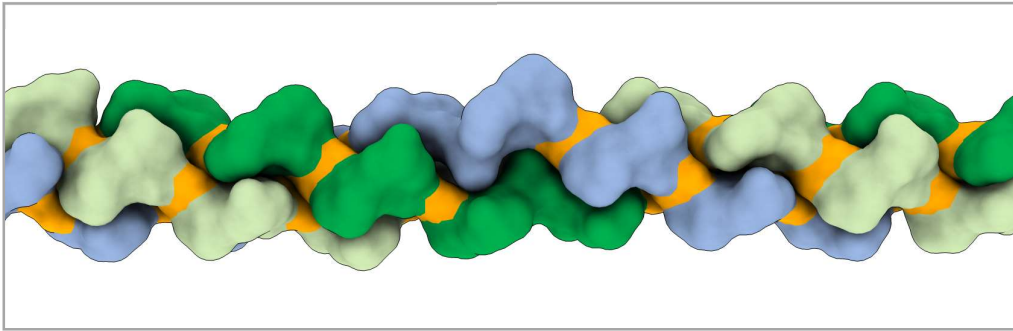
Le collagène IV forme un réseau au niveau de la membrane basale sur lequel se fixe de nombreux types cellulaires (a). Trois chaînes alpha vont former la structure en triple hélice de l'hétérotrimère (b). Les domaines 7S de 4 molécules de collagènes vont s'associer entre eux (c) et les domaines NC1 vont s'associer par 2 (d).

KL. Brown et al (198)

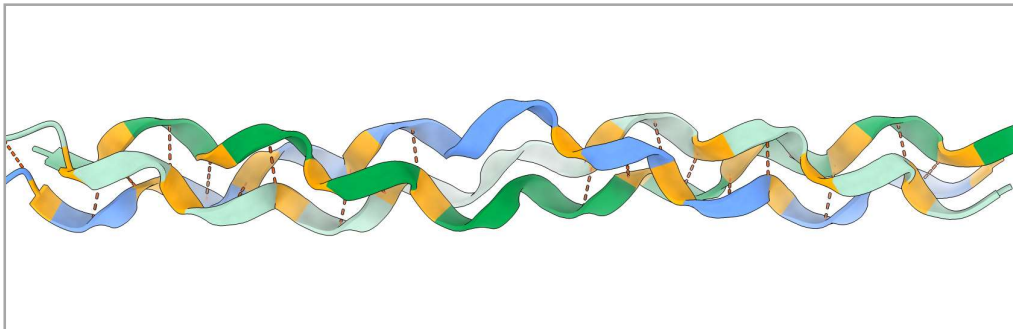
Le domaine collagénique :

Les chaînes alpha constituant le collagène de type IV se caractérisent par la répétition d'un motif Gly-X-Y formant le domaine collagénique (207) (Figure 14a). Dans ce motif, la présence de la glycine est systématique alors que les deux autres acides aminés X et Y correspondent généralement à des résidus proline et hydroxyproline (208). La présence d'une glycine en position axiale de la triple hélice de collagène est un élément déterminant pour la stabilité du collagène de type IV (Figure 14b). En effet, seule la chaîne latérale de la glycine, réduite à un atome d'hydrogène, permet l'enroulement étroit des chaînes alpha constituant la triple hélice de collagène (209,210). Ainsi, le rôle de la glycine au sein d'un domaine collagénique est primordial et sa substitution par un autre acide aminé dont la chaîne latérale est plus volumineuse est susceptible d'induire d'importantes perturbations structurales et fonctionnelles du collagène de type IV (210,211).

a. « Surface moléculaire »



b. « Cartoon »



c. « Structure atomique »

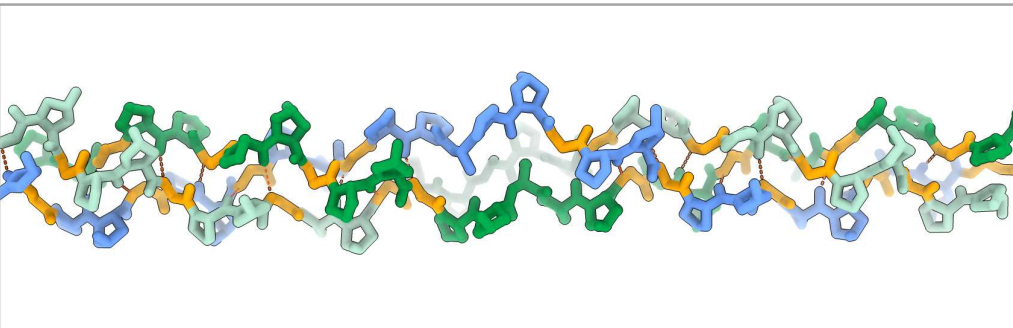


Figure 14 : Structure de la triple hélice de collagène.
Représentations d'une molécule de collagène. Chaque chaîne alpha de collagène s'enroule sur elle-même, et autour d'un axe virtuel, formant une triple hélice. Les résidus glycines (orange) stabilisent la triple hélice via des liaisons hydrogènes (rouge). La région centrale sépare 2 domaines collagéniques et ne comporte pas de glycine, ne permettant pas la présence de liaisons hydrogènes, formant ainsi une structure plus lâche.

2. Le syndrome d'Alport

a. Aspects génétiques

Les six chaînes alpha constitutives du collagène de type IV sont codées par six gènes (*COL4A1* à *COL4A6*) ayant la particularité sur le plan génomique d'être groupés en paires sur trois chromosomes différents (les autosomes 2 et 13 et le gonosome X) ((196,200)). Chaque paire de gènes présente la même organisation en « tête à tête » avec une orientation transcriptionnelle inverse et partage un promoteur commun (Figure 15).

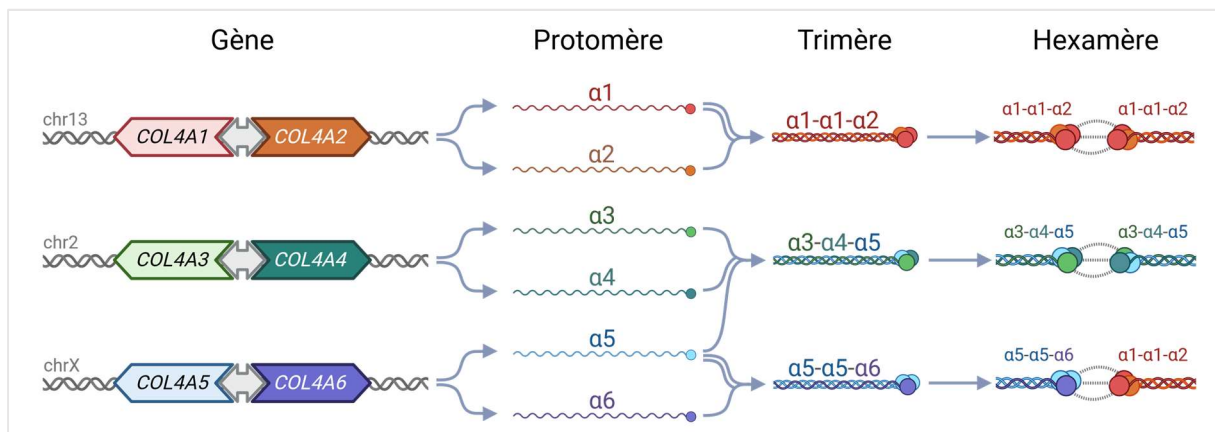


Figure 15 : Gènes *COL4A1* à 6 codant pour les isoformes des chaînes alpha de collagène.

Les gènes *COL4A1* à 6 codent pour les protocollagènes $\alpha 1$ à $\alpha 6$ qui s'assemblent en trimères $\alpha 1$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$, $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ ou $\alpha 5$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$. La région NC1 de ces trimères interagissent pour former un hexamère, à l'origine du réseau de collagène.

De plus, la structure primaire des chaînes alpha présente des homologies importantes, notamment au niveau du domaine NC1, permettant leur classification en deux groupes : les chaînes alpha-1-like, incluant les chaînes alpha-1, -3 et -5, et alpha-2-like, comportant les chaînes alpha-2, -4 et -6 (212). Ceci suggère l'existence d'un gène ancestral commun qui s'est dans un premier temps dupliqué au même locus et que cette paire de gènes s'est par la suite tripliquée sur deux autres chromosomes (213,214).

Le syndrome d'Alport est dû à des anomalies génétiques au niveau des gènes *COL4A3*, *COL4A4* et *COL4A5*, codant respectivement les chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ du collagène de type IV, à l'origine d'une altération de la membrane basale en particulier au niveau glomérulaire (215). Les variants délétères au niveau du gène *COL4A5*, localisé en Xq22.3, sont à l'origine du syndrome d'Alport lié à l'X alors que les altérations des gènes *COL4A3* et/ou *COL4A4*, situés sur le chromosome 2, sont moins fréquentes et sont responsables d'une forme autosomique de syndrome d'Alport transmise selon un mode récessif voire dominant (216,217). Plusieurs milliers de variants pathogènes ont été identifiés au niveau des gènes responsables du syndrome d'Alport comme l'indiquent les bases de données LOVD (<https://www.lovd.nl/>) et Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Dans 10 à 15% des cas, ces altérations

correspondent à des remaniements géniques impliquant une partie plus ou moins étendue d'un ou plusieurs gènes à l'origine du syndrome d'Alport, notamment des délétions de grande taille pouvant aller jusqu'à la perte complète du gène (218) ou des duplications en tandem (219). Dans les autres cas, il s'agit de variants ponctuels, en particulier des mutations faux-sens qui sont les plus fréquentes, et également des variants non-sens ou affectant l'épissage ainsi que des petites délétions/insertions induisant une modification du cadre de lecture (220). Parmi les mutations faux-sens, celles affectant les résidus glycine sont particulièrement abondantes (221). En effet, ce type de mutation, fréquemment observé dans la plupart des maladies héréditaires du collagène, est responsable d'un effet dominant négatif en raison d'un défaut d'enroulement de la triple hélice de collagène et ce d'autant plus que l'acide aminé substituant la glycine a une chaîne latérale volumineuse (222). De manière intéressante, plusieurs études se sont attachées à établir des corrélations génotype-phénotype chez les individus atteints de syndrome d'Alport et les résultats les plus probants ont été obtenus chez les individus de sexe masculin porteurs de variants délétères au niveau du gène *COL4A5* (223,224). Ces études ont en effet établi que les patients dont le génotype montre un remaniement important du gène *COL4A5* ou la présence de variants tronquants progressent plus rapidement vers une IRCT que ceux porteurs d'une mutation pathogène faux-sens (222). Enfin, les patients porteurs d'une substitution d'un résidu glycine au niveau du gène *COL4A5* ont généralement un phénotype plus sévère que ceux porteurs d'une mutation affectant un autre acide aminé (222,223,225).

b. Aspects cliniques

Le syndrome d'Alport est un trouble héréditaire défini par une néphropathie hématurique évoluant vers l'insuffisance rénale chronique souvent associée à des manifestations rénales telles qu'une surdité de perception ou une atteinte oculaire (226,227). Néanmoins, le syndrome d'Alport se caractérise par une hétérogénéité clinique marquée en raison de ses différents modes de transmission et de la nature des mutations incriminées (222,223). Ainsi, le syndrome d'Alport devrait être évoqué devant toute hématurie microscopique persistante d'origine glomérulaire, sans étiologie précise, aussi bien chez un enfant que chez un adulte.

Dans la plupart des cas, le syndrome d'Alport est dû à des mutations du gène *COL4A5* et est transmis selon un mode dominant lié au chromosome X (228). Les individus de sexe masculin, n'ayant qu'un seul chromosome X, sont de ce fait obligatoirement porteurs de la mutation et sont généralement plus sévèrement atteints que leurs pendants féminins (229). En effet, chez celles-ci, l'un des deux chromosomes X est inactivé aléatoirement au cours de l'embryogenèse, et de ce fait, la moitié des cellules possède le chromosome X actif normal tandis que dans l'autre moitié, le chromosome X actif est porteur de l'altération génétique (230). Ainsi, les hommes atteints ont une évolution systématique vers l'IRCT, typiquement

entre 20 et 50 ans, alors que chez les femmes conductrices, seules environ 15% d'entre elles développent une IRCT avant l'âge de 40 ans (228). Dans 10-15% des cas, la transmission du syndrome d'Alport suit une transmission autosomique récessive liée à des mutations bialléliques des gènes *COL4A3* ou *COL4A4* (228). La sévérité de la néphropathie est alors comparable entre les hommes et les femmes atteints, avec une évolution vers l'IRCT généralement avant l'âge de 30 ans (228). Enfin, des formes autosomiques dominantes affectant un seul des deux allèles des gènes *COL4A3* ou *COL4A4* sont également rapportées. Elles sont caractérisées par une grande variabilité dans la sévérité des lésions rénales et la faible occurrence des manifestations extrarénales (231) (Tableau 4).


Enfin, certaines formes cliniques particulières de syndrome d'Alport ont également été décrites. Il s'agit notamment du syndrome d'Alport associé à une léiomyomatose œsophagienne diffuse, secondaire à une délétion contiguë impliquant les gènes *COL4A5* et *COL4A6*, et du syndrome Alport-like caractérisé par l'association d'une néphropathie familiale héréditaire avec surdité et cataracte et d'une macrothrombocytopenie mais dont l'anomalie génétique n'implique pas les gènes codant le collagène de type IV mais le gène *MYH9* (232,233).

Tableau 4 : Classifications des différentes formes de syndrome d'Alport.

Une atteinte du gène *COL4A5* sera responsable d'un syndrome d'Alport lié à l'X. Les hommes sont hémizygotés et développeront une forme sévère, alors que les femmes hétérozygotes développeront une forme de sévérité variable. Le syndrome d'Alport autosomique implique les gènes *COL4A3* et/ou *COL4A4*. La présence d'un variant hétérozygote sera responsable d'une forme dominante alors que la présence de deux variants (hétérozygotie composite ou digénisme) sera responsable d'une forme récessive.

Historiquement, la définition du syndrome d'Alport se basait sur des éléments cliniques et histologiques, et séparait en différentes entités, le syndrome d'Alport, l'hématurie familiale bénigne et le pseudo-Alport. Grâce à l'essor du séquençage à haut débit, de nouvelles études ont montré que le syndrome d'Alport et l'hématurie familiale bénigne correspondaient à un continuum de tableaux cliniques causés par des anomalies des gènes codant le collagène IV. Cette classification exclut le syndrome *MYH9* qui ne correspond pas à une atteinte du collagène IV.

SAAD : Syndrome d'Alport autosomique dominant, SAAR : Syndrome d'Alport autosomique récessif SALX : Syndrome d'Alport lié à l'X, ♀ : chez un individu féminin, ♂ : chez un individu masculin

SALX [♂] / SAAD	SALX [♂] / SAAR	MYH9
Classification clinique (historique)		
Hématurie Familiale Bénigne	Syndrome d'Alport	Pseudo Alport
Classification génétique (actuelle)		
Syndrome d'Alport (sévérité variable) -  +		Non Alport

c. Aspects histologiques

Les anomalies génétiques au niveau des gènes *COL4A3*, *COL4A4* ou *COL4A5* sont à l'origine d'un défaut dans la formation de l'hétérotrimère $\alpha3\text{-}\alpha4\text{-}\alpha5(\text{IV})$ et d'une altération de la membrane glomérulaire du rein en raison de la persistance anormale de l'hétérotrimère $\alpha1\text{-}\alpha2(\text{IV})$ et de sa plus grande sensibilité à l'action des protéases (234). Dans les stades précoces, les reins sont souvent optiquement normaux puis des lésions glomérulaires non spécifiques se développent telles qu'un épaissement segmentaire de la paroi capillaire ou une sclérose segmentaire du flocculus (235,236). A l'inverse, l'étude ultrastructurale permet d'identifier des altérations plus spécifiques, en particulier un épaissement irrégulier de la MBG et sa fragmentation ainsi qu'un feuilletage de la *lamina densa* (Figure 16) (237). L'épaississement de la MBG est généralement diffus chez l'adulte, alors que chez l'enfant il est segmentaire et peut être associé à un deuxième type d'altération, la membrane basale mince, qui peut être prédominant (238).

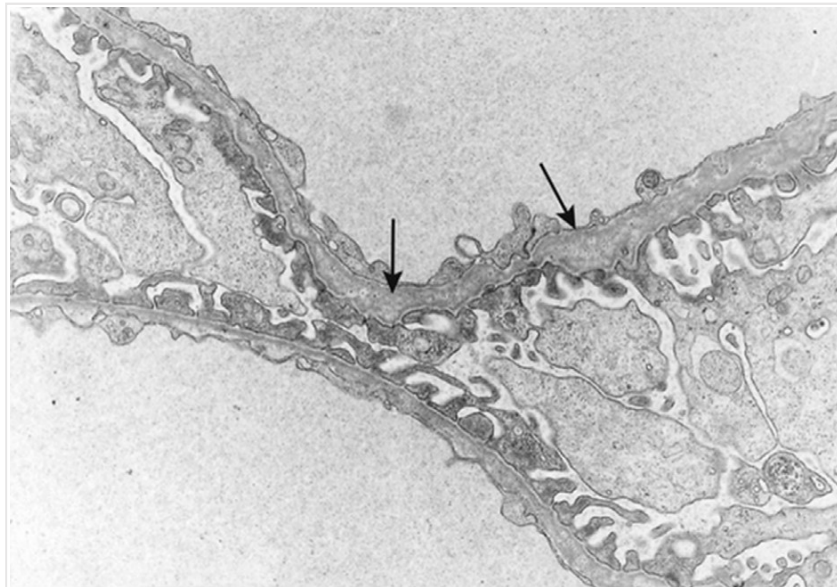


Figure 16 : Atteinte glomérulaire en microscopie électronique (237). Aspect ultra-structural du glomérule dans le syndrome d'Alport. Les flèches indiquent les régions de la MBG épaissies et feuilletées.

Une étude de cas d'une anomalie structurale du gène *COL4A4* à l'origine d'un syndrome d'Alport est présentée sous la forme d'un article didactique en Annexe 2 (page 115) du document.

Annexe 2

Whole-genome sequencing revealed a novel structural variant in *COL4A4* causing autosomal dominant Alport syndrome

Delage C, Andreani M, Boukrout N, Perrais M, Lefebvre B, Cauffiez C, Pottier N, Larrue R,

Les MRC secondaires

I. ROLE DU CISPLATINE ET DE MIR-21

Outre les causes génétiques, les MRC peuvent également être secondaires à une exposition chronique à des agents environnementaux néphrotoxiques (239,240). Parmi eux, nous nous sommes intéressés à un composé anti-cancéreux largement prescrit, le cisplatine.

1. Le cisplatine : un agent néphrotoxique

Michele Peyrone identifie en 1884 un dérivé chloré, le cis-diamine-dichloro-platine ou CDDP, qu'il nomme chlorure de Peyrone, mieux connu actuellement sous l'appellation cisplatine (241). Ses propriétés cytotoxiques ont été découvertes, de façon fortuite, par Barnett Rosenberg en 1965 en étudiant les effets des champs magnétiques sur la croissance de la bactérie *Escherichia coli* (242). En effet, Barnett Rosenberg utilisait dans ses expériences des électrodes de platine immergées dans une solution de chlorure d'ammonium dont la corrosion, en libérant du platine dans le milieu de montage, induisait la formation d'un complexe toxique pour les bactéries, le dichlorodiamineplatine (242). Les effets anticancéreux du cisplatine ont ensuite été mis en évidence en 1969 dans un modèle murin de leucémie lymphocytaire (243). Le cisplatine reçoit finalement une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats-Unis en 1978 (244). Cet agent anti-cancéreux est actuellement utilisé dans de nombreux protocoles de chimiothérapie, notamment dans les cancers bronchopulmonaires (245).

a. Mécanisme d'action antitumorale

Le cisplatine est l'un des dérivés du platine les plus couramment utilisés en oncologie (246). Il s'agit d'un composé de structure plane avec en position centrale un atome de platine relié, d'une part, à deux groupements amine en configuration *cis* et, d'autre part, à deux groupements chlorure (Figure 17).

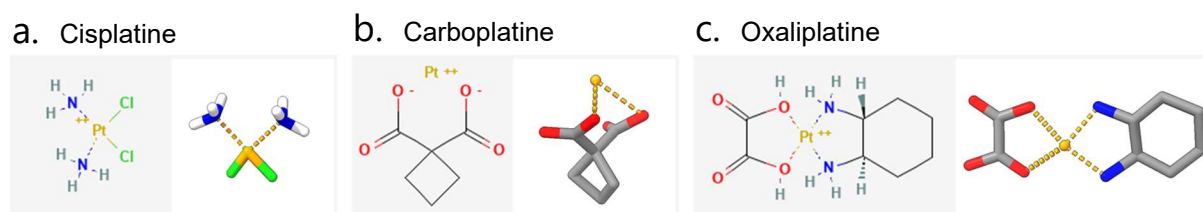


Figure 17 : Principaux sels de platines utilisés en chimiothérapie. Représentation bidimensionnelle (gauche) et tridimensionnelle (droite) d'une molécule de cisplatine (a), de carboplatine (b) et d'oxaliplatine (c). (Couleurs CPK) (PubChem CID : 441203, 10339178, 6857599)

Le cisplatine, initialement inerte, se transforme en un composé hautement réactif au contact de l'eau, par un mécanisme d'aquation, capable d'induire la formation d'adduits au niveau de la molécule d'ADN (247). Le cisplatine, initialement inerte, se transforme en un composé hautement réactif au contact de l'eau, par un mécanisme d'aquation, capable d'induire la formation d'adduits au niveau de la molécule d'ADN (248) (Figure 18).

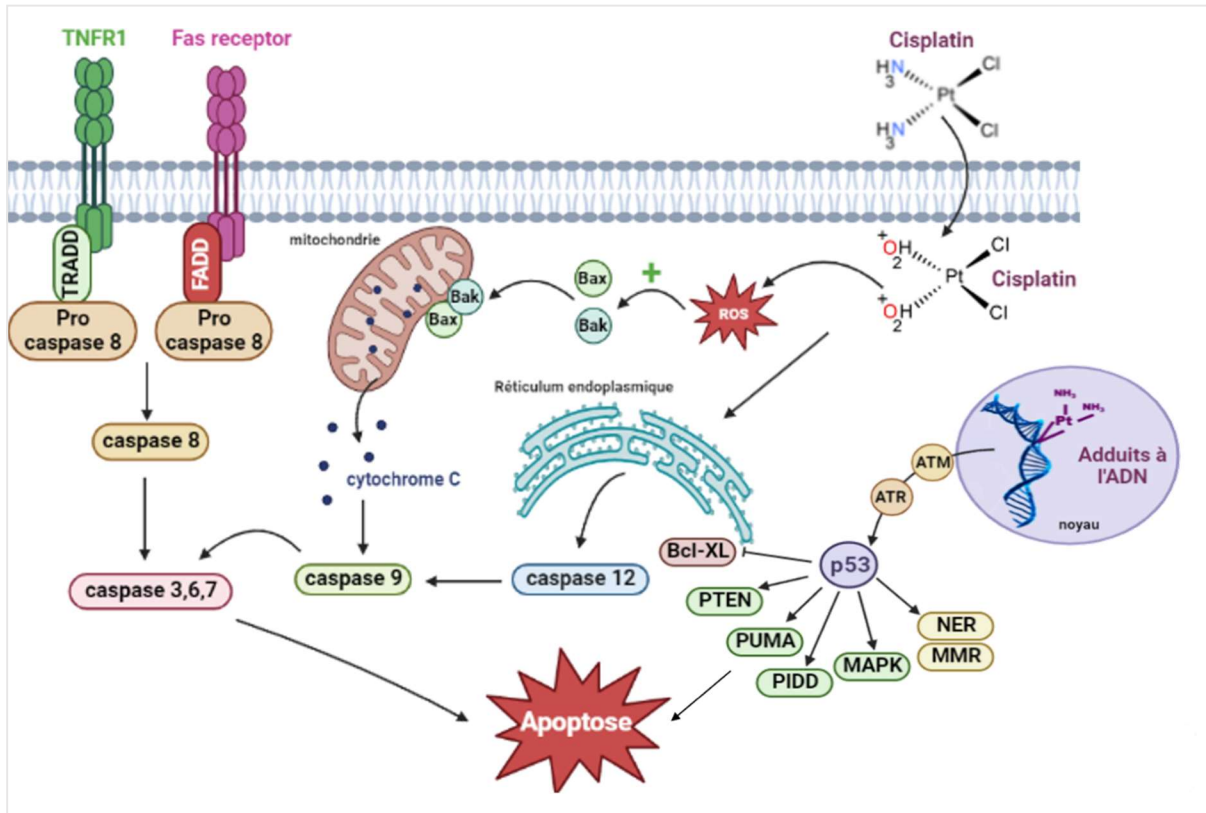


Figure 18 : Mécanisme d'action du Cisplatine.

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

Le cisplatine fait ainsi partie des agents alkylants qui, en formant des liaisons covalentes avec la chaîne d'ADN, déforment sa structure en double hélice et bloquent les processus de transcription et de réplication, pour aboutir au phénomène de mort cellulaire (Figure 19) (249). Néanmoins, malgré ses propriétés anticancéreuses, le cisplatine, comme la plupart des agents antinéoplasiques, est associé à la survenue de nombreux effets indésirables parfois graves et une chimiorésistance (250).

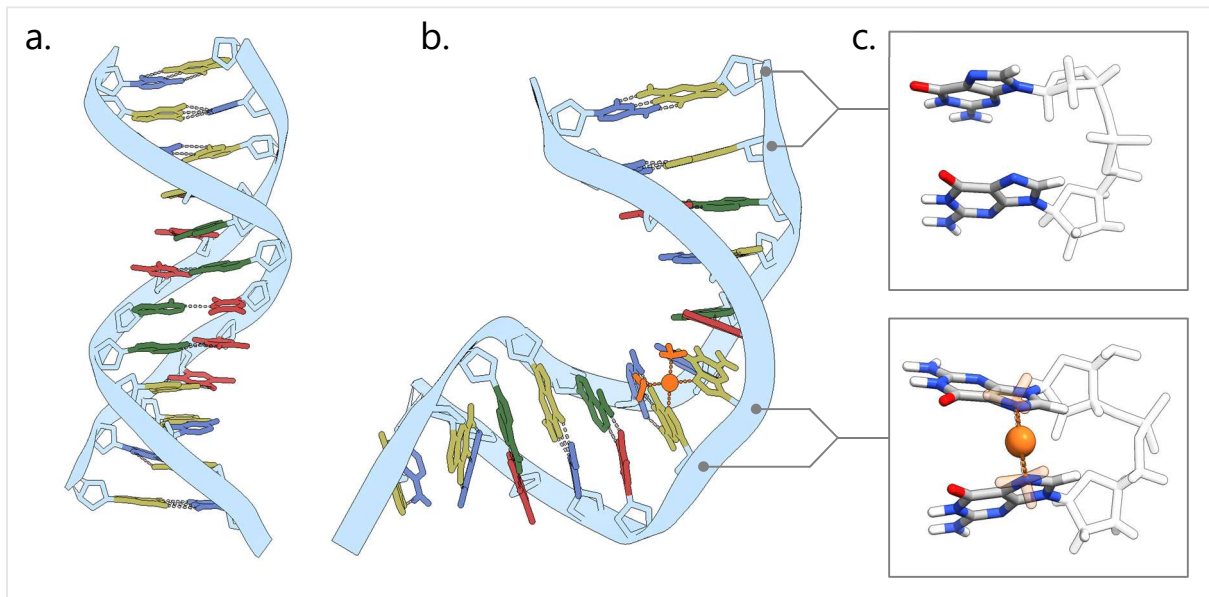


Figure 19 : Mécanisme d'action du Cisplatine (voie génotoxique). Conformation normale d'ADN double brin (ADN-B)(a). Structure déformée d'ADN double brin suite à la fixation de cisplatine (orange) (b). Visualisation (couleurs CPK) de deux guanines adjacentes en conformation naturelle (c haut) ou en présence de cisplatine (c bas). A noter que les deux séquences nucléotidiques (a) et (b) ne sont pas strictement identiques. (PDB ID : 3bna (a), 1a84 (b))

b. Néphrotoxicité du cisplatine

Les protocoles de chimiothérapie à base de cisplatine exposent les patients à la survenue d'effets indésirables parfois graves, pouvant dans certains cas limiter son utilisation avec à terme un risque de réduire les taux de réponse des tumeurs aux traitements (251). Parmi les différents phénomènes toxiques connus, la néphrotoxicité du cisplatine est particulièrement fréquente. En effet, on estime que 20 à 40% des patients pourraient développer une toxicité rénale lors d'un traitement à base de cisplatine (252). La néphrotoxicité induite par le cisplatine se caractérise par une atteinte préférentielle des cellules du tube contourné proximal à l'origine d'une insuffisance rénale à diurèse conservée de profil tubulo-interstitiel le plus souvent réversible et transitoire (252). En effet, au niveau intracellulaire, le cisplatine est pris en charge par différentes voies de biotransformation aboutissant à la formation de composés thiols hautement réactifs à l'origine d'un dysfonctionnement des mitochondries et du réticulum endoplasmique ainsi que d'effets génotoxiques au niveau de l'ADN (253). Ces altérations induisent, outre la formation d'espèces réactives de l'oxygène, l'activation de plusieurs signaux biologiques à l'origine de la mort des tubes contournés proximaux par apoptose, nécrose et nécroptose (254).

2. Le microARN MiR-21, un acteur en physiopathologie rénale

a. ARN non codants

La connaissance du génome humain a connu une avancée spectaculaire au début des années 2000, notamment grâce à la complétion du « Projet Génome Humain » et le séquençage de 90% du génome humain (255). En effet, contrairement à ce que la communauté scientifique supposait à cette époque, il est apparu que la majorité du génome chez l'homme ne codait pas des protéines et que la fraction codante ne représentait que 2% de l'ADN humain (255,256). Puis, en 2003, était initié le projet « encode » qui visait cette fois à répertorier l'intégralité des éléments fonctionnels du génome humain et à identifier le rôle biologique de l'ADN non codant (257). Une des grandes découvertes du projet « encode » publiée en 2012 repose sur le fait que plus de 80% du génome humain serait fonctionnel et qu'une fraction significative de l'ADN non codant est transcrite sous la forme d'ARN n'ayant pas la capacité à être traduit en protéines et dont le rôle biologique consiste à réguler l'expression génique (258). Enfin, grâce à l'avènement des techniques de séquençage à haut débit, ces ARN non codants (ARNnc) ont pu être caractérisés et il est désormais bien établi que ces biomolécules sont, d'une part, extrêmement diverses en termes de fonctions biologiques, structures et tailles et que, d'autre part, elles jouent un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire (Figure 20, (259)). Parmi ces différents transcrits, les microARN font partie des ARNnc les mieux caractérisés à l'heure actuelle (260).

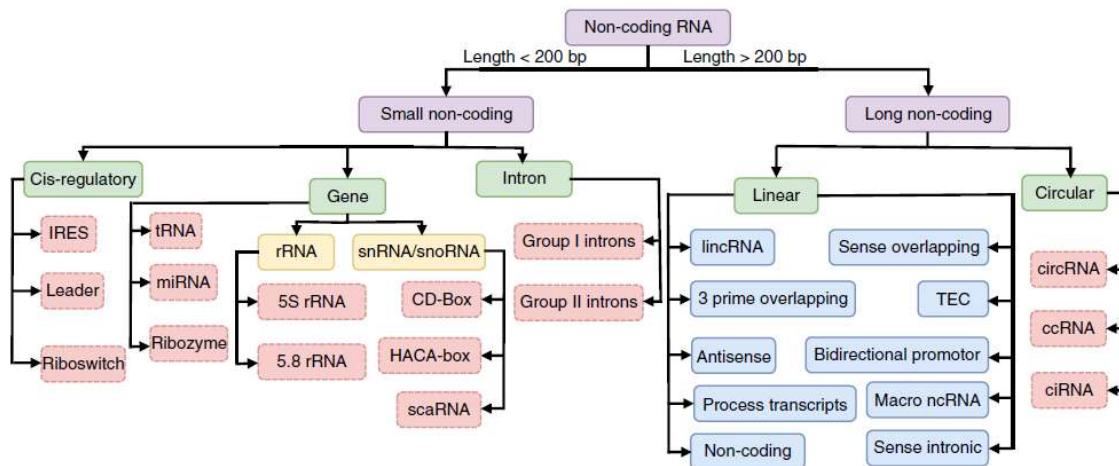


Figure 20 : Taxonomie des ARN non codants. Classification générée par une approche par « deep learning » en fonction de leurs tailles, de leurs structures et de leurs fonctions. D'après N. Amin et al., 2019 (259).

Une revue regroupant les principales connaissances concernant le rôle biologique des ARN non codants à travers l'exemple de DN3OS est présentée sous la forme d'un article didactique en Annexe 3 (page 123) du document.

Annexe 3

Pervasive role of the long noncoding RNA DN3OS in development and diseases.

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

Wiley Interdiscip Rev RNA. 2023 Mar;14(2):e1736.* Contributed equally

b. Les microARN

Les microARN ou miARN constituent une classe d'acides ribonucléiques non codants simple brin, d'environ vingt nucléotides, dont la principale fonction biologique consiste en la régulation négative de l'expression génique (261). Depuis la découverte en 2000 du premier miARN humain, let-7, environ 1900 miARN ont été répertoriés chez l'homme (miRbase version v22.1). De plus, de nombreuses études par perte et gain de fonction de plusieurs miARN dans des modèles *in vivo* ont permis de démontrer leur importance au cours de l'embryogenèse et dans de nombreux autres processus biologiques tels que la différenciation cellulaire (262).

i. BIOGENESE ET REGULATION DES MICROARN

Les gènes de miARN ont une localisation génomique très variable. Certains, comme miR-21, sont situés dans des régions intergéniques et ont de ce fait leur propre unité transcriptionnelle (263). D'autres, comme miR-10b, sont situés dans les introns de gènes codant des protéines et leur transcription est initiée à partir d'une séquence promotrice qui leur est spécifique ou dépend de l'activation de la transcription de leur gène hôte (264). Enfin, certains miARN peuvent être regroupés en cluster, tel que miR-17-92a-1, et leur transcription donne lieu à un seul transcrit primaire dit polycistronique (265).

Chez les métazoaires, la transcription des miARN implique généralement l'ARN polymérase de type II et aboutit à la formation d'un transcrit primaire de taille variable, le pri-miARN dont les principales caractéristiques sont une structure en épingle à cheveux présentant des mésappariements, une coiffe methyl-7-guanine à l'extrémité 5' ainsi qu'une queue polyadénylée en 3' (Figure 21) (266). Ce pri-miARN est ensuite hydrolysé en un transcrit d'une soixantaine de nucléotides, le pré-miARN, par le microprocesseur : un complexe enzymatique hétéromérique constitué d'une endonucléase de type III dénommée DROSHA et de DCGR8, une protéine de liaison à l'ARN (Figure 21) (267). Ce pré-miARN, dont l'extrémité 5' comporte un groupement phosphate et l'extrémité 3' deux nucléotides flottants, est exporté dans le

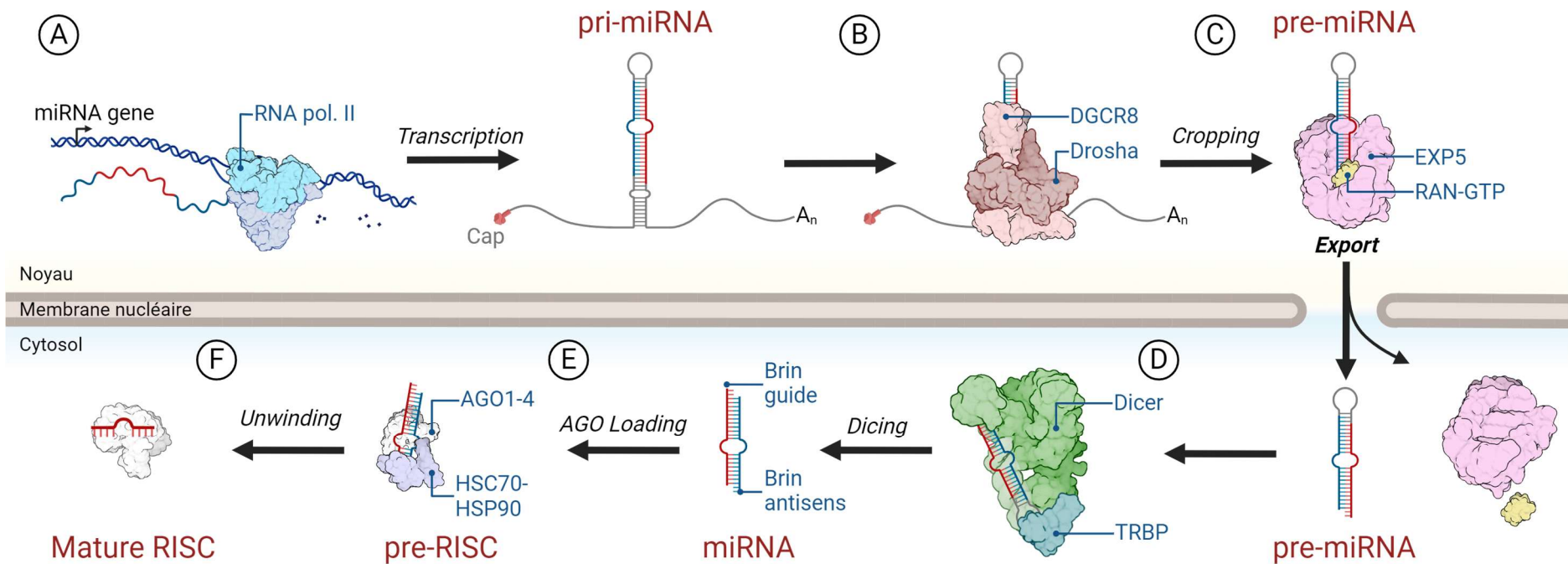


Figure 21 : Etapes de biogénèse et de maturation des microARN (voie « canonique »).

A, B, C : étapes nucléaires de la maturation; D, E, F : étapes cytoplasmique de la maturation

Transcription du pri-miARN par l'ARN polymérase II (RNA pol. II) (A). Le pri-miARN est intégré au complexe Drosha/DGCR8 permettant sa maturation en pré-miRNA (B). L'exportine 5 (EXP5), en association avec la RAN-GTPase permet l'export cytoplasmique du pré-miARN (C). Le pré-miARN est intégré dans le complexe comprenant Dicer et la protéine TRBP (TAR RNA-binding protein) qui permet sa maturation en un miARN composé d'un brin sens et d'un brin antisens (D). Le miARN est intégré dans le complexe AGO1-4 grâce au complexe HSC70-HSP90 (heat shock cognate 70 – heat shock protein 90), hydrolysant un ATP (E). Le brin antisens du miARN est libéré afin de former le complexe RISC mature (F)

(PDB ID : 7ob9, 6v5b, 5b16, 5ciq, 3a6p, 5zam, 4wyq, 5aqv, 6oon)

cytoplasme grâce à l'exportine 5, un transporteur de la famille des Ran GTPase (Figure 21) (268). Enfin, une dernière étape de maturation impliquant le complexe enzymatique DICER (269) permet la libération d'un duplex d'une vingtaine de nucléotides constitués du miARN mature (ou brin guide) et du brin antisens (Figure 21) (270,271). Le miARN mature est alors inclus au sein du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) pour former un complexe ribonucléoprotéique fonctionnel (Figure 21) (272). Ces différentes étapes constituent la voie canonique de maturation des miARN (Figure 21). D'autres voies dites « non canoniques », dans lesquelles les nucléases DROSHA et DICER ne sont pas nécessaires, ont également été décrites (273,274).

ii. MECANISMES D'ACTION ET FONCTIONS BIOLOGIQUES DES miARN

Les miARN sont d'importants régulateurs de l'expression des gènes grâce à un mécanisme de reconnaissance leur permettant d'induire la dégradation et/ou l'inhibition de la traduction des transcrits codant leurs gènes cibles (Figure 22) (272,275). En effet, chez l'homme, les miARN possèdent dans leur région 5' un site de reconnaissance complémentaire de la région 3'UTR de leurs ARN cibles d'environ 6 pb (nucléotides 2 à 7), appelé séquence « seed » (276). La reconnaissance des ARN cibles par le complexe miR-RISC induit le recrutement des protéines de la famille GW182 qui jouent un rôle essentiel dans le processus de régulation médié par les miARN, en interagissant avec d'autres protéines dont celles de la famille EIF4 associées à l'hydrolyse de la coiffe 5' ou PABPC (polyA binding protein cytoplasmic) impliquées dans le processus de déadénylation (277,278).

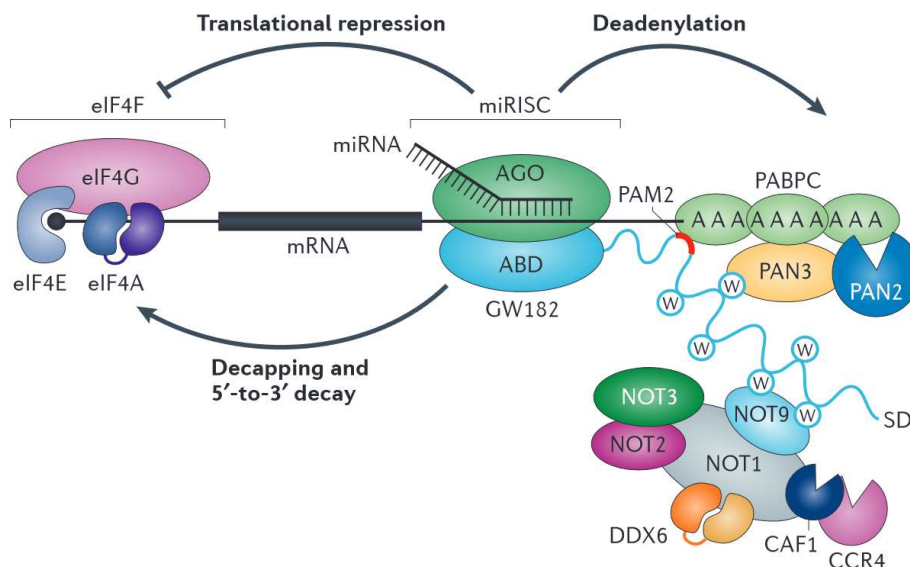


Figure 22 : Mécanisme de répression des miARN chez l'animal. Le microARN lié à la protéine Argonaute (AGO) dans le complexe RISC (miRNA-induced silencing complex, miRISC) reconnaît son ARN messager (ARNm) cible. La protéine AGO interagit avec une protéine GW182 pour recruter à son tour des protéines permettant l'inhibition de la traduction (inhibition du complexe eIF4F), la désadénylation (PABPC, complexe de désadénylation), le décoiffage et la dégradation de l'ARNm. D'après Jonas et Izaurralde, 2015 (272)

De nombreuses études se sont efforcées d'identifier les fonctions biologiques des miARN et trois grands modes d'action ont été définis comme l'indique la Figure 23 :

- Boucle d'anticipation où le miARN et son inducteur régulent la même cible. Dans ce cas, le miARN augmente l'action de l'inducteur ou stabilise le processus biologique (Figure 23 a).
- Boucle de régulation négative où le miARN régule négativement son inducteur. Ce système participe au maintien de l'homéostasie cellulaire (Figure 23 b).
- Boucle de rétrocontrôle positive où le miARN régule positivement son inducteur, renforçant ainsi son activité biologique (Figure 23 c).

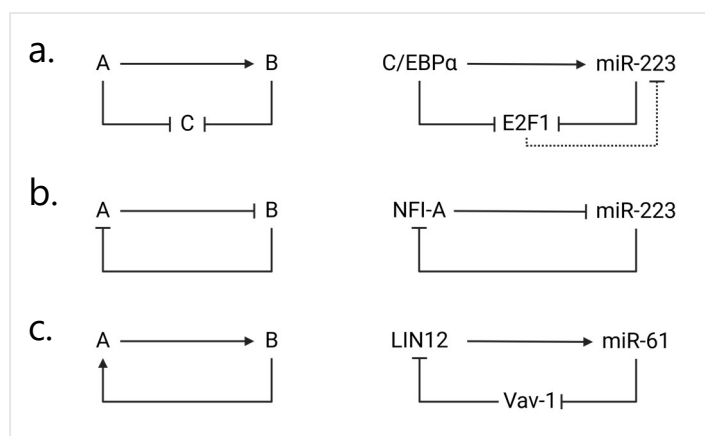


Figure 23 : Mécanismes d'action des miARN par boucles de rétrocontrôle

Boucle d'anticipation (a) : Exemple de l'inhibition directe et indirecte de E2F1, un régulateur du cycle cellulaire impliqué dans la granulopoïèse. Boucle de régulation négative (b) : Exemple de l'inhibition réciproque de miR-223 et NFI-A permettant un maintien de l'équilibre entre précurseurs myéoïdes et granulocytes. Boucle de régulation positive (c) : Exemple du renforcement de l'engagement vers la différenciation en cellules vulvaires chez le nématode. D'après Ebert and Sharp 2012.

Au total, les miARN constituent une classe de petits ARNnc endogènes impliqués dans la régulation négative de l'expression génique et par conséquent le contrôle de la plupart des processus cellulaires (279). Ainsi, leur dérégulation est associée à de très nombreuses pathologies dont certaines affections neurologiques, inflammatoires, cardiovasculaires ou encore rénales (280,281). Les miARN jouant un rôle délétère dans ces différentes pathologies sont recensés dans la base de données Human MicroRNA Disease Database (HMDD, <http://www.cuilab.cn/hmdd>).

c. miR-21 en physiologie et pathologie rénale

En raison de son implication dans de très nombreuses situations physiopathologiques, miR-21 est l'un des miARN les mieux caractérisés à l'heure actuelle (263,266). De plus, il est quantitativement un des miARN les plus représentés au niveau tissulaire (282). Ainsi, miR-21 pourrait représenter une cible thérapeutique pertinente et de nombreuses études se sont attachées à évaluer, à l'échelle préclinique, l'efficacité thérapeutique de stratégies permettant

son inhibition notamment dans le cadre de pathologies rénales telles que le syndrome d'Alport (283,284) .

Une revue regroupant les principales connaissances concernant le rôle de miR-21 en physiopathologie rénale est présentée sous la forme d'un article didactique en Annexe 4 (page 141) du document.

Annexe 4

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

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

Cells, 11(21):3525

Travaux personnels

- **Identification de nouveaux déterminants moléculaires associés à la maladie rénale chronique primitive :**
Exemple de la néphronophtise et du syndrome d'Alport.
-

Objectifs

Ce premier axe vise à identifier de nouveaux déterminants moléculaires associés au développement de deux néphropathies héréditaires : la néphronophtise (Annexe 1) et le syndrome d'Alport (Annexe 2) par des techniques analytiques innovantes dont le séquençage à haut débit. En effet, le séquençage du génome entier (WGS) est une technique relativement récente qui présente l'avantage majeur d'identifier de manière fiable et simultanée l'ensemble des variants introniques profonds et des variants structuraux.

I. NEPHRONOPHTISE

Dans le cadre du diagnostic moléculaire de pathologies rénales héréditaires, une première étude a été réalisée dans une famille pour laquelle l'histoire clinique était très en faveur d'une néphronophtise et pour laquelle les premières analyses génétiques n'avaient pas permis de confirmer ce diagnostic (article 1). Le whole-genome Sequencing des membres de la famille a permis de mettre en évidence deux nouveaux variants du gène *NPHP3* d'intérêt : les variants c.520-1G>T et c.671-996C>G. Le caractère délétère de ces deux variants, initialement classés comme « pathogènes » selon les critères proposés par l'American College of Medical Genetics en 2015 (285), a ensuite été confirmé par séquençage de l'ARNm leucocytaire. Nos résultats indiquent que le variant c520-1G>T active un site cryptique d'épissage au niveau de l'exon 3, huit paires de bases en aval du site accepteur d'épissage, conduisant à un décalage du cadre de lecture et à l'introduction d'un codon stop prématuré (p.Ile174Glyfs*6). Le variant 671-996C>G, quant à lui, est responsable d'un épissage aberrant avec, en particulier, l'insertion d'un exon cryptique de 163 pb au niveau de l'intron 3, 48 pb en aval du site donneur d'épissage de l'exon 3, générant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré en position 240. Ainsi, les résultats de cette analyse ont montré la présence de deux nouveaux variants au sein du gène *NPHP3*, associés à des anomalies d'épissage du transcrit *NPHP3*.

II. SYNDROME D'ALPORT

Le diagnostic de syndrome d'Alport repose principalement sur la symptomatologie clinique des patients et l'étude anatomopathologique des membranes basales glomérulaires à partir de la biopsie rénale (238). La réalisation d'une biopsie rénale reste néanmoins un geste invasif associé à la survenue de complications potentiellement graves (286,287). Ces dernières années, le séquençage à haut débit a révolutionné le diagnostic moléculaire du syndrome d'Alport en limitant le recours en première intention à la biopsie rénale (288,289). Néanmoins, les stratégies de séquençage ciblées qui sont à l'heure actuelle les plus couramment utilisées dans les laboratoires hospitaliers posent le problème de la détection des variants structuraux qui sont relativement fréquents dans le syndrome d'Alport. Nous rapportons ici, l'étude d'une famille présentant un tableau clinique et paraclinique typique de syndrome d'Alport autosomique dominant et pour laquelle une première analyse de séquençage ciblée des gènes *COL4A3*, *COL4A4* et *COL4A5* s'était révélée non concluante. Nous avons donc procédé à une analyse par Whole-Genome Sequencing afin d'étendre l'étude génétique aux régions introniques et aux potentiels variants structuraux des gènes impliqués dans la survenue du syndrome d'Alport. L'étude des régions introniques et exoniques des gènes *COL4A3*, *COL4A4* et *COL4A5* n'a pas mis en évidence de variants ponctuels potentiellement pathogènes d'après les critères définis par l'ACMG en 2015 (285). En revanche, une analyse bioinformatique (290) dédiée à la recherche des variants structuraux a permis l'identification d'une délétion d'environ 7,4 kb affectant l'exon 20 et une partie des introns adjacents du gène *COL4A4* à l'état hétérozygote. Un test rapide par PCR a par la suite été développé et appliqué aux différents membres de la famille.

Au total, ces deux études démontrent l'intérêt clinique du WGS dans le diagnostic moléculaire des néphropathies héréditaires, en particulier pour la mise en évidence des variants introniques profonds délétères et des variants structuraux. Ces travaux ont fait l'objet de deux publications (Annexe 1 et Annexe 2).

Travaux personnels

- **Identification de nouveaux déterminants moléculaires associés à la maladie rénale chronique secondaire :**

Rôle des ARN non codants dans les anomalies de réponse au cisplatine

Objectifs

Le deuxième axe de ces travaux de thèse porte sur la néphrotoxicité du cisplatine, une molécule pouvant conduire à une MRC secondaire.

Depuis sa première administration chez l'homme dans les années 1970, le cisplatine a pris une place importante dans l'arsenal thérapeutique anti-cancéreux et a actuellement de nombreuses indications, notamment dans les néoplasies pulmonaires, gynécologiques, urologiques et aéro-digestives (245). Le cisplatine appartient à la classe des agents alkylants (248). En se fixant sélectivement sur les bases puriques de l'ADN, il entraîne une déformation locale du double brin d'ADN, à l'origine de l'inhibition des mécanismes de réplication et de transcription, et conduisant à terme à la mort cellulaire principalement par apoptose (291). Au niveau cytoplasmique, le cisplatine établit également des interactions avec les résidus cystéines de nombreuses protéines, en particulier la forme réduite du glutathion, des métallothionéines et des méthionines (248). Les liaisons covalentes ainsi formées participent aux effets cytotoxiques du cisplatine, notamment par l'augmentation du stress oxydant qui renforce les dommages à l'ADN (292). Malgré ses propriétés anti-tumorales remarquables, l'utilisation du cisplatine est en partie limitée par l'apparition d'une chimiorésistance et d'effets indésirables potentiellement sévères.

Alors que le génome humain est constitué d'environ 3,4 milliards de paires de bases, seule une fraction minoritaire (environ 2%) est traduite en protéine (255,256). Une part importante des ARN ne code pas des protéines et sont dénommés non codants. Parmi eux, les miARN, identifiés pour la première fois en 1993, sont actuellement les mieux caractérisés (293). Ainsi, bien que la découverte des miARN et de leur mode d'action ait révolutionné l'étude des mécanismes physiopathologiques de la plupart des maladies complexes, peu de données concernant leur implication dans les anomalies de réponse au cisplatine sont actuellement disponibles (294). Dans ce contexte, nos travaux ont permis d'une part, de démontrer l'importance de miR-92a-3p dans la sensibilité des tumeurs pulmonaires au cisplatine (Annexe Y) et d'autre part, d'apporter des résultats préliminaires concernant le rôle de miR-21 dans les effets néphrotoxiques du cisplatine.

I. ROLE DE MIR-92A-3P DANS LA REPONSE DES TUMEURS PULMONAIRES AU CISPLATINE

Dans cette partie de ma thèse, une approche de criblage par perte de fonction a été effectuée afin d'identifier les miARN dont l'inhibition favorise la sensibilité des adénocarcinomes pulmonaires (LUAD) au cisplatine. Nous avons notamment montré *in vitro* l'importance de miR-92a-3p dans la réponse antitumorale du cisplatine. Ce travail a fait l'objet d'une publication qui figure en Annexe 5 (page 155) du document.

Annexe 5

MiR-92a-3p regulates cisplatin-induced cancer cell death

Larrue R, Fellah S, Boukrout N, De Sousa C, Lemaire J, Leboeuf C, Gougeon M, Perrais M, Cauffiez C, Pottier N, Van der Hauwaert C

Cell Death Dis. 14(9), 603

II. RESULTATS PRELIMINAIRES :

ROLE DE miR-21 DANS LA NEPHROTOXICITE INDUITE PAR LE CISPLATINE

L'utilisation du cisplatine est limitée par des effets indésirables fréquents, en particulier de type néphrotoxique (252). Ainsi, ses effets néphrotoxiques s'expriment chez 20 à 40% des patients et se caractérisent par une insuffisance rénale à diurèse conservée de profil tubulointerstitiel (254). Le mécanisme de toxicité rénale, encore imparfaitement compris, repose sur une atteinte préférentielle des cellules du tube contourné proximal et s'accompagne d'un dysfonctionnement du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (295). Les effets toxiques du cisplatine peuvent alors conduire à limiter les doses de cisplatine, voire à modifier le traitement, générant de ce fait une diminution de l'efficacité de la chimiothérapie et donc un risque d'évolution péjorative de la pathologie tumorale (296). Par conséquent, il est primordial de développer des approches réduisant significativement la néphrotoxicité du cisplatine.

miR-21 représente un des miARN les plus étudiés et de nombreuses publications rapportent son implication dans l'initiation et la progression de nombreuses pathologies rénales (297,298). En effet, plusieurs études montrent qu'il pourrait exercer un rôle bénéfique ou au contraire un rôle délétère en fonction du contexte (caractère aigu ou chronique des lésions) et de la nature de l'agent agresseur (298). Néanmoins, son implication dans la survenue des effets néphrotoxiques induits par le cisplatine n'est à l'heure actuelle pas documentée. Seule une étude longitudinale portant sur des patients atteints d'un mésothéliome et traités par une chimiothérapie à base de platine a montré que la concentration urinaire de miR-21 augmentait après administration intra-pleurale de cisplatine mais sans être prédictive d'insuffisance rénale aiguë (299).

L'objectif des travaux de cet axe repose sur l'exploration du rôle de miR-21 dans un modèle murin de néphropathie tubulaire aiguë en réponse à une exposition systémique au cisplatine. Ce modèle expérimental combiné à l'utilisation d'une lignée de souris déficientes pour miR-21 devrait notamment permettre d'évaluer la pertinence de la modulation pharmacologique de ce miARN comme stratégie de prévention de cet effet indésirable.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Modèle murin

Des souris C57/Bl6 sauvages ou déficientes pour miR-21 et âgées de moins de 3 mois ont été soumises à une injection intrapéritonéale unique de cisplatine (10 mg/kg) ou de solution saline (n= 8-10 souris / groupe). Les souris ont été euthanasiées 72 h après injection de cisplatine. Des prélèvements sanguins ont été réalisés afin d'évaluer la fonction rénale des animaux. Les échantillons sanguins ont été recueillis par prélèvement au niveau du sinus rétro-orbitaire sur tube hépariné puis centrifugés à 1500g pendant 15 minutes à température ambiante. Après sacrifice des souris, les reins ont été prélevés. Un rein a été fixé dans du formol à 10% tamponné en vue d'analyses histologiques alors que l'autre rein a été coupé dans le plan frontal en deux parties égales pour pouvoir réaliser, d'une part, l'extraction des ARN totaux et, d'autre part, l'extraction des protéines. Les souris déficientes en miR-21 ont été obtenues grâce à une collaboration avec le Dr Olson (Université du Texas).

2. Dosage de l'urée et de la créatinine

Les concentrations plasmatiques d'urée et de créatinine des échantillons ont été déterminées par méthode enzymatique à partir des plasmas sanguins préalablement dilués au quart dans du sérum physiologique et à l'aide d'un automate Cobas 8000 (Roche Diagnostics).

3. Analyse histologique

Après 24h de fixation dans du formol tamponné à 10%, les reins sont ensuite transférés dans un bain d'éthanol à 70% puis inclus en paraffine. Des coupes histologiques sont réalisées puis colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E) en vue d'analyse en microscopie optique et un score d'atteinte tubulaire rénale a été défini comme l'indique le Tableau 5.

Tableau 5 : Critères histologiques permettant d'établir le score d'atteinte tubulaire.

Score	Lésions
0 (absente)	Aucune
1 (minimale)	Nécrose, débris
2 (légère)	Nécrose, apoptose
3 (modérée)	Dilatation tubulaire, vacuolisation
4 (sévère)	Nécrose épithélium, épithélium aminci
5 (très sévère)	Nécrose étendue

4. Mesure quantitative des miARN et des ARNm tissulaires

a. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux tissulaires rénaux, dont les microARN, ont été extraits par dissociation des reins dans 5mL de Trizol (ThermoFisher) à l'aide du gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec). Après ajout de 1mL de chloroforme, les échantillons sont agités vigoureusement pendant 15 secondes, puis incubés 2 à 3 minutes à température ambiante et enfin centrifugés à 4°C pendant 45 minutes à 4000g. Les ARN totaux sont ensuite précipités par ajout d'une solution d'isopropanol (Vol./Vol.). Après une période d'incubation de 10 minutes à température ambiante, les échantillons sont à nouveau centrifugés pendant 45 minutes à 4000g à 4°C et un culot d'ARN est obtenu. Après élimination du surnageant, les culots sont lavés deux fois à l'aide d'une solution d'éthanol à 75%. Enfin, les culots sont séchés à l'air libre puis dissous dans 300µL d'eau RNase-free et la concentration en ARN des échantillons est évaluée par spectrophotométrie (260nm) à l'aide du Biotech Spec-nano (Shimadzu Biotech).

b. Expression des miARN

La rétrotranscription des miARN est réalisée à l'aide du kit TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) dans un volume final de 15µL et à partir de 5ng d'ARN total dans un thermocycleur Verity (Life Technologies) selon les recommandations du fabricant. Deux sondes ont été utilisées : l'une permettant la rétrotranscription spécifique de miR-21 (TaqMan microRNA hsa-miR-21 ; assay 397 de Life Technologies), l'autre permettant la rétrotranscription spécifique du petit ARN nucléolaire snoRNA-251 (TaqMan microRNA snoRNA-251 ; assay 1236 ; Life Technologies) servant de référence.

La PCR en temps réel est réalisée en chimie TaqMan dans un volume final de 15µL contenant 1,4µL de la solution de rétrotranscription, 1µL de sonde spécifique TaqMan et 10µL de tampon TaqMan Universal MasterMix II no UNG (Life Technologies) à l'aide de l'appareil StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies). L'analyse des données est effectuée par la méthode comparative des $\Delta\Delta Ct$. Le Cycle Threshold où Ct correspond au seuil à partir duquel le niveau de fluorescence diffère significativement du bruit de fond.

Le signal obtenu pour miR-21 est normalisé par rapport au snoARN-251 par la formule suivante :

$$\Delta Ct = Ct^{miR-21} - Ct^{sno251}$$

La relation mathématique : $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^{ech. cible} - \Delta Ct^{ech. ctrl}$ permet d'exprimer les niveaux d'expression relative (RQ) d'un échantillon par rapport à un échantillon contrôle (300).

c. Expression des transcrits codants

La rétrotranscription est réalisée dans un volume final de 15 μ L à l'aide du thermocycleur Verity (Life Technologies) à partir d'1 μ g d'ARN total et du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) selon les recommandations du fabricant. La PCR en temps réel est réalisée en chimie TaqMan à l'aide de l'appareil StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies) dans un volume final de 15 μ L à partir de 1 μ L de la solution de rétrotranscription, 10 μ L de tampon TaqMan Universal MasterMix II no UNG (Life Technologies) et d'1 μ L de sondes TaqMan spécifiques. Les sondes spécifiques utilisées (Life Technologies) sont les suivantes : KIM-1 (gène *HAVCR1*, assay Mm00506686_m1), NGAL (gène *LCN-2*, assay Mm01324470_m1), HO-1 (gène *HMOX-1*, assay Mm00516005_m1) et IL-6 (gène *IL6*, assay Mm00446190_m1). Le gène de référence utilisé est la cyclophiline A (gène *PPIA*, assay Mm02342430_g1). L'analyse des données est effectuée à l'aide de la méthode comparative des $\Delta\Delta C_t$ décrite ci-dessus.

d. Statistiques

Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel PRISM 7. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Le test de Student ou le test ANOVA ont été utilisés pour comparer les différents groupes de souris. Le résultat est considéré comme significatif si $p < 0,05$.

IV. RESULTATS

1. Mise en place d'un modèle murin de néphrotoxicité induite par le cisplatine.

Dans un premier temps, nous avons mis en place le modèle murin de néphrotoxicité induite par le cisplatine. Nos résultats montrent que l'injection d'une dose unique de cisplatine à 10mg/kg s'accompagne invariablement d'une altération de leur état général se traduisant par une perte de poids et d'une dégradation de leur fonction rénale caractérisée par une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'urée et de créatinine (Figure 24).

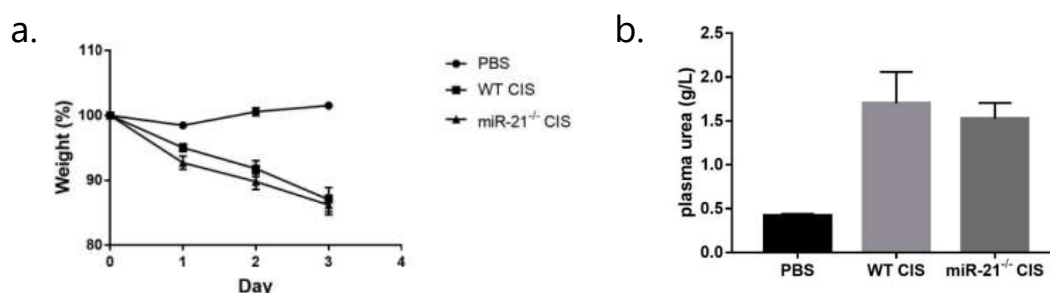


Figure 24 : Conséquences de l'administration de cisplatine sur le poids et la fonction rénale (modèle murin). Le cisplatine induit une perte de poids et une dégradation de la fonction rénale. (a) Courbes de poids chez les animaux ayant reçu une dose de 10mg/kg de cisplatine ou une injection de PBS. (b) Urémie chez les animaux ayant reçu une dose de 10mg/kg de cisplatine ou une injection de PBS. PBS : Phosphate Saline Buffer. $n = 2$, WT CIS : $n = 8$, miR-21^{-/-}: $n = 15$. Impact de miR-21 sur les lésions rénales induites par le cisplatine

L'atteinte rénale induite par le cisplatine a également été étudiée par des analyses histologiques (scoring des lésions de toxicité rénale et la mesure de l'expression du marqueur de souffrance rénale NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)(Figure 25).

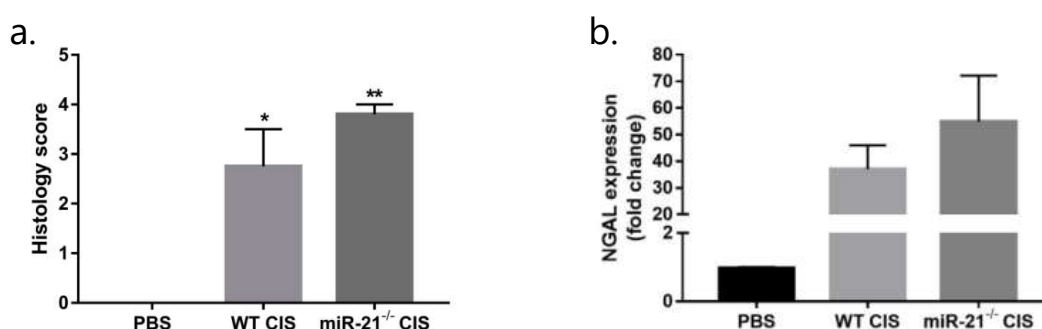


Figure 25 : Conséquences de l'administration de cisplatine sur le score histologique et l'expression de NGAL (modèle murin). (a) Score d'atteinte tubulaire évalué sur les coupes de reins provenant des souris ayant reçu une dose de 10mg/kg de cisplatine ou une injection de PBS et (b) expression rénale de NGAL, un marqueur de souffrance rénale, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. PBS : $n = 2$, WT CIS : $n = 8$, miR-21^{-/-}: $n = 15$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

De plus, et comme attendu, nos résultats montrent que l'injection intrapéritonéale d'une dose unique de cisplatine est suffisante pour induire une souffrance rénale d'autant plus importante que la dose de cisplatine est élevée (Figure 26).

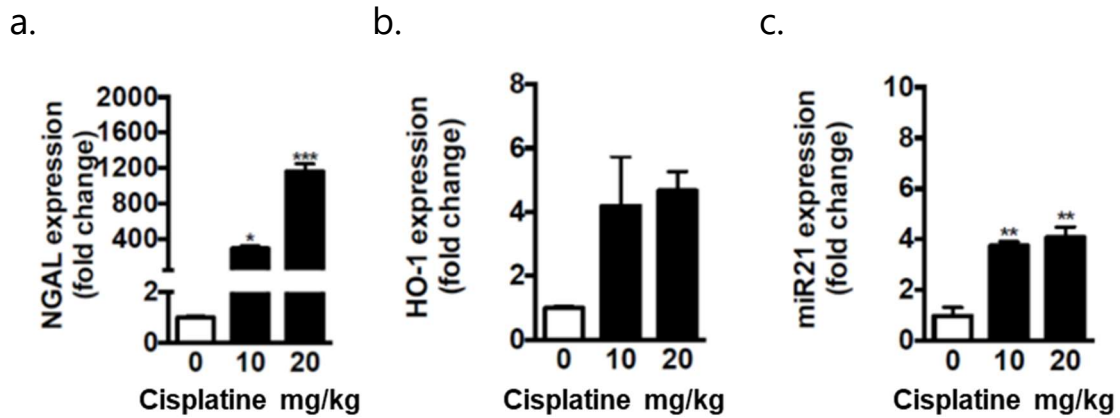


Figure 26 : Conséquences de l'administration de cisplatine sur l'expression de NGAL, HO-1 et miR-21. Expression du gène NGAL (A), du gène HO-1 (B) et du microARN miR-21 (C) dans un modèle murin après une exposition à différentes concentrations de cisplatine (0, 10, 20 mg/kg). $n = 4$ animaux/groupes. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ (comparé à la dose 0 de cisplatine).

De manière intéressante, nos résultats montrent également que le développement de lésions rénales en réponse au cisplatine s'accompagne d'une augmentation de l'expression rénale de miR-21 indépendamment du sexe des animaux (Figure 27).

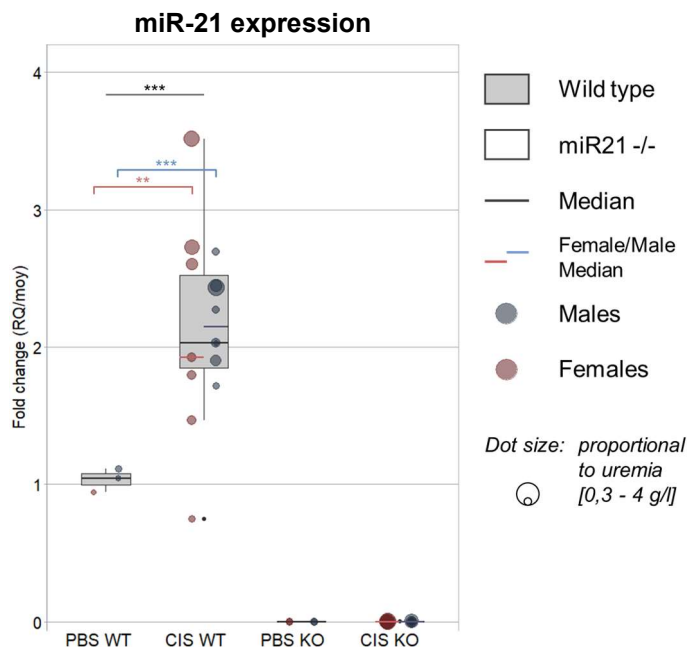


Figure 27 : Expression de miR-21 en fonction du sexe et du génotype. Expression de miR-21 chez les souris wild-type et KO ($miR-21^{-/-}$), avec ou sans administration de cisplatine et en fonction du sexe des animaux. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

2. Impact de miR-21 sur les lésions rénales induites par le cisplatine

Nous avons ensuite évalué si miR-21 pouvait être impliqué dans la sévérité des lésions rénales induites par le cisplatine. Pour cela, nous avons utilisé des souris déficientes en miR-21 dont le génotype est miR-21^{-/-}. Une première étape a consisté à quantifier l'expression de miR-21 dans les différents groupes d'animaux étudiés afin de confirmer leur génotype (Figure 27). Comme attendu, les souris de génotype miR-21^{-/-} ont une expression rénale de miR-21 négligeable dont le Ct est proche de 40 (Figure 27). Puis, des souris de génotype miR-21^{-/-} et leurs contrôles appariés selon leur sexe et âge ont été exposées à une dose unique de cisplatine à 10mg/kg. Les souris dont le génotype est sauvage ont une expression rénale de miR-21 significativement augmentée lorsqu'elles sont traitées au cisplatine (Figure 27). Enfin, ces données ont pu être confirmées par, en particulier, la mesure de l'expression rénale du marqueur NGAL, et du marqueur pro- inflammatoire IL-6 (Figure 28). De plus, en tenant compte du sexe des animaux, les femelles déficientes pour miR-21 présentent une toxicité rénale accrue du cisplatine (Figure 28).

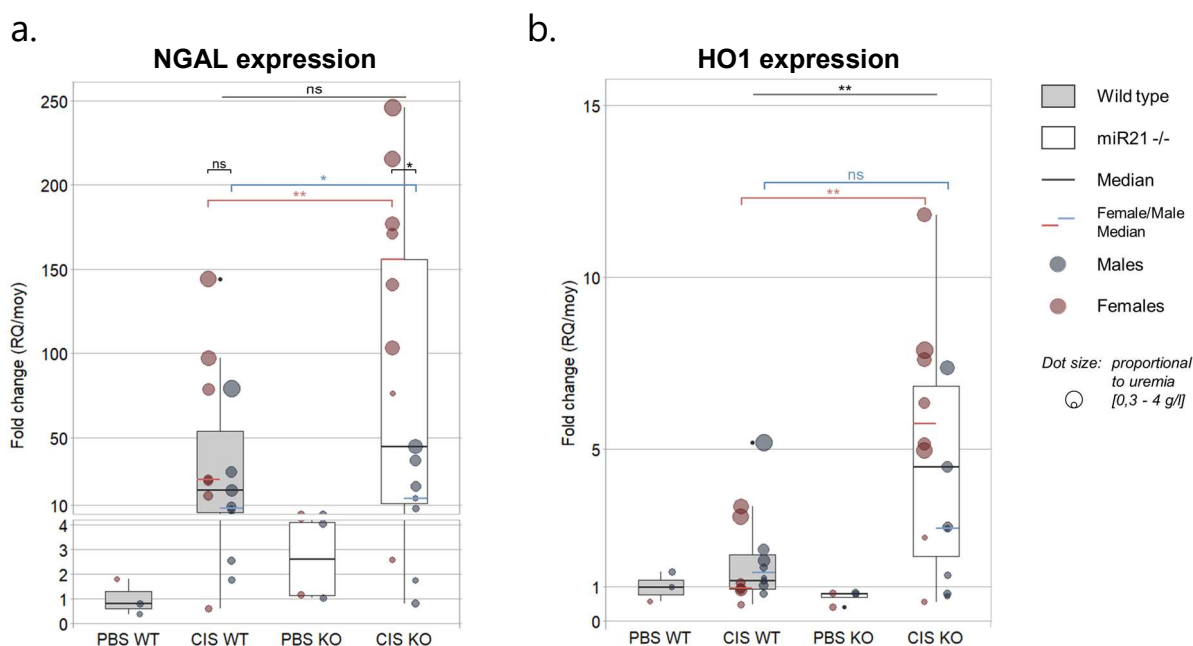


Figure 28 : Expression des marqueurs d'atteinte rénale en fonction du génotype.

Expression du marqueur (a) de souffrance rénale NGAL et (b) de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 chez les souris wild-type et KO (miR-21^{-/-}), avec ou sans administration de cisplatine et en fonction du sexe des animaux.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

V. DISCUSSION

La néphrotoxicité du cisplatine est un problème important en oncologie et est responsable d'une prise en charge suboptimale des patients (301). Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ce phénomène toxique, bien qu'encore imparfaitement connus, comprennent essentiellement une toxicité directe au niveau du tube contourné proximal avec à la fois une nécrose et une apoptose accrue, des lésions vasculaires et une réponse inflammatoire marquée (302).

Nos données apportent de nouveaux éclairages sur la toxicité rénale du cisplatine en suggérant le rôle déterminant que pourrait jouer certains ARN non codants, en particulier un miARN : miR-21. En particulier, nos résultats montrent que l'expression rénale de ce miARN est augmentée au cours de la néphrotoxicité induite par le cisplatine ce qui est en accord avec de très nombreuses études ayant démontré sa surexpression lors d'un stress tissulaire aigu ou chronique quelle qu'en soit la cause (303,304). En effet, miR-21 est un miARN ubiquitaire dont la surexpression est constante dans de très nombreuses conditions pathologiques telles que le processus de fibrogenèse, la cancérogenèse, en situations ischémiques ou lors d'un stress oxydant (303,305,306). Par exemple, une augmentation de l'expression de miR-21 dans les cellules fibroblastiques en réponse à une agression tissulaire chronique contribue à leur activation et leur différenciation en myofibroblastes, un des types cellulaires clés du processus de fibrose (307). Plusieurs études ont également montré l'induction précoce de miR-21 en situations d'ischémie aigüe comme lors de l'infarctus du myocarde (308–310). Enfin, une augmentation de l'expression de miR-21 dans le tissu rénal est rapportée dans la majorité des modèles d'insuffisance rénale aigüe et lors de la progression de plusieurs pathologies rénales chroniques (305,311). Par exemple, Hennino et al. (312) ont montré que le niveau d'expression rénale de miR-21 était associé à la sévérité de la fibrose rénale interstitielle chez des patients atteints de la maladie de Berger.

De manière intéressante, nos résultats suggèrent que l'induction de miR-21 dans le tissu rénal en réponse au cisplatine jouerait un rôle néphroprotecteur en particulier chez les souris femelles. Ces résultats sont également en accord avec les données de la littérature, celles-ci suggérant un rôle ambivalent de miR-21, protecteur ou délétère, selon le contexte aigu ou chronique des lésions rénales (312,313). En effet, parmi les différentes études ayant évalué l'effet de la perte de fonction de miR-21 dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion, seule l'étude de Chau et al. (314) montre que l'inhibition de miR-21 aurait un effet bénéfique pour la fonction rénale. Néanmoins, dans l'étude de Chau et al., l'analyse des effets de l'inhibition de miR-21 est relativement tardive (10 jours après ischémie) et ne tient pas compte du rôle précoce que pourrait exercer miR-21 lors du processus d'ischémie-reperfusion. Ainsi, il est

possible que miR-21 joue un rôle protecteur dans les événements précoces associés au processus d'ischémie-reperfusion puis un rôle délétère une fois les lésions de nécrose tubulaire aiguë initiées. Par ailleurs, l'intensité de l'agression rénale est un élément potentiellement déterminant pour la mise en évidence des effets néphroprotecteurs de miR-21 et des études complémentaires restent nécessaires pour étayer cette hypothèse. En particulier, l'administration de doses croissantes de cisplatine à des souris déficientes pour miR-21 devraient permettre d'établir un lien de causalité entre l'intensité de l'agression rénale et un éventuel rôle néphroprotecteur de miR-21. Enfin, il serait également intéressant d'évaluer les effets d'oligonucléotides antisens dirigés contre miR-21 sur les lésions induites par le cisplatine. Cette approche pharmacologique de type perte de fonction permettrait notamment d'étudier plus en détail la cinétique de l'effet protecteur de miR-21, en modulant, d'une part, la durée d'inhibition, et, d'autre part, le délai par rapport à la lésion initiale.

En conclusion, nos travaux concernant la néphrotoxicité du cisplatine soutiennent l'hypothèse d'un effet protecteur de miR-21 au cours des événements précoces survenant lors d'une agression rénale. L'identification des gènes cibles de miR-21 et des voies de signalisation régulées par sa surexpression au cours de la toxicité rénale induite par le cisplatine reste néanmoins une étape importante et nécessaire pour formellement établir le rôle néphroprotecteur de miR-21. Ces données *in vitro* devraient en effet permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents ainsi que la chronologie et l'intrication des différents événements moléculaires impliqués.

Discussion Générale

Au cours des dernières décennies, des avancées majeures ont été accomplies dans la compréhension des maladies rares héréditaires, notamment grâce à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la survenue de ces pathologies (255,256,258). L'analyse génétique est ainsi devenue une étape incontournable dans la prise en charge de nombreux affections mendéliennes rares (315). En effet, les progrès dans la classification des variants génétiques, l'amélioration des performances des tests moléculaires et la diminution des coûts des techniques de séquençage ont contribué à placer l'analyse génétique en première ligne dans la démarche diagnostique de nombreuses maladies rares dont les néphropathies héréditaires (316–318). De nombreuses études suggèrent par exemple qu'une proportion significative d'adultes et d'enfants atteints d'une maladie rénale chronique ont une cause monogénique identifiable qu'il est important de ne pas méconnaître pour des raisons ayant trait au diagnostic, au pronostic et également à la prise en charge thérapeutique (319,320).

Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit, couplées au progrès de la bioinformatique, ont révolutionné la génétique moléculaire (321). En effet, ces technologies ont permis d'améliorer considérablement le rendement diagnostique tout en diminuant significativement le délai d'obtention des résultats et sont devenues de ce fait un outil incontournable dans la plupart des laboratoires de biologie médicale en charge du diagnostic moléculaire (322). Les techniques NGS présentent en effet l'avantage de pouvoir détecter tous les types d'altérations moléculaires connues, depuis les variants ponctuels jusqu'aux variants structuraux (323). Plusieurs applications sont possibles selon la nature de l'anomalie génétique, sa localisation génomique ou le type d'acides nucléiques étudiés, les principales étant le séquençage complet du génome, le séquençage de l'exome, le séquençage d'un panel de gènes ou encore le séquençage de l'ARN (322,323). L'identification des variants génétiques d'un individu chez qui une maladie génétique est suspectée (plusieurs millions de variants pour un séquençage complet du génome) est relativement complexe, requiert la comparaison à une séquence de référence et nécessite différents outils bioinformatiques permettant la filtration et l'annotation des données ainsi que le recours à des bases de données publiques contenant les résultats de séquençage de plusieurs centaines de milliers d'individus présumés sains ayant des origines ethniques différentes (324). Le lien de causalité entre une anomalie génétique et le phénotype d'un patient est souvent difficile à établir, en particulier dans le cas des variants faux-sens ; ce qui peut conduire dans certains cas à un diagnostic erroné (325). C'est pourquoi, l'American College of Medical Genetics a élaboré une série de

recommandations visant à standardiser l'interprétation des variants génétiques en se basant sur plusieurs critères tels que les données de la littérature, la fréquence des variants identifiés, le résultat d'études fonctionnelles, les bases de données dédiées aux maladies rares ou encore des scores de prédiction établis *in silico* (285). Ces recommandations permettent de classer les variants selon cinq niveaux : bénins, probablement bénins, de signification indéterminée, probablement pathogènes et pathogènes (285). L'identification de variants dont la signification est incertaine est un cas de figure particulièrement fréquent qui nécessite, pour préciser leur éventuelle pathogénicité, de réaliser des explorations complémentaires notamment des études fonctionnelles, rarement réalisées dans le cadre du diagnostic (326). Outre l'identification de variants ponctuels, le séquençage de nouvelle génération permet également l'identification de variants structuraux, notamment lors du séquençage de génome entier (327). La mise en évidence de ce type de mutation est particulièrement importante dans le cadre du diagnostic moléculaire car les variations du nombre de copies sont une cause fréquente de maladies héréditaires (328). Par exemple, de nombreux variants structuraux ont été décrits dans le cadre des néphropathies d'origine génétique, comme une délétion récurrente du gène *NPHP1* responsable de néphronophtise ou une délétion partielle du gène *CTNS* à l'origine de la cystinose (329,330).

Outre l'identification des causes génétiques des troubles héréditaires, la connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'initiation et la progression de la pathologie est indispensable, notamment pour permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques (331). A ce titre, l'étude du rôle exercé par les ARN non codants paraît particulièrement pertinente de par leur importance reconnue en physiopathologie et la relative facilité de développer des agents pharmacologiques les ciblant Figure 29 (332,333).

A titre d'exemple, miR-21 apparaît comme un candidat intéressant dans le cadre des néphropathies héréditaires, notamment le syndrome d'Alport (284,334). En effet, une étude préclinique portant sur le syndrome d'Alport a démontré le rôle central exercé par la surexpression de miR-21 dans le développement de l'atteinte rénale en altérant la fonction des mitochondries (335,336). De manière intéressante, l'administration de molécules oligonucléotidiques antisens dirigées contre miR-21 dans ce modèle a permis d'améliorer significativement les lésions rénales, les paramètres rénaux (albuminurie et fonction rénale) et la survie des souris (284). Ainsi, des stratégies thérapeutiques basées sur la restauration du niveau d'expression aberrante d'un miARN sont en cours de développement et certaines d'entre elles sont en phase d'essai clinique notamment dans le syndrome d'Alport (Tableau 6) (334,337–341).

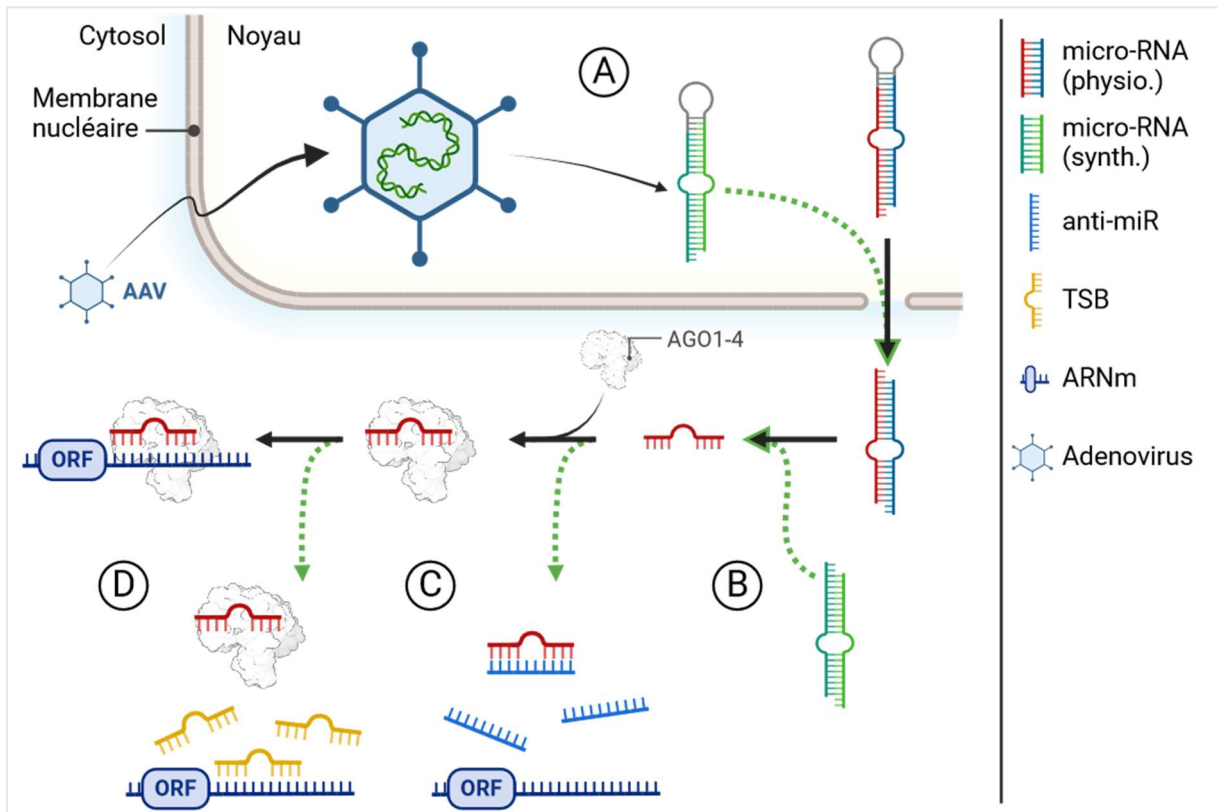


Figure 29 : Agents pharmacologiques inhibant l'action des micro-ARN. Stratégies ciblant les miARN en vue de restaurer (a,b) ou inhiber (c,d) leurs activité. Stratégies de restauration d'expression de miARN par l'apport de précurseurs via des vecteurs de type adénovirus (a) ou de mimics (b). Stratégie d'inhibition de miRNA par séquestration du miARN mature par un anti-miR (c), ou par inhibition compétitive de l'ARNm cible par un TSB (Target Site Blocker)(d).

Une des approches visant à restaurer le niveau d'expression d'un miARN consiste à introduire un oligonucléotide de synthèse, double brin, dont la séquence est identique au miARN mature endogène (343). Ce duplex, formé du brin « guide » correspondant au miARN mature d'intérêt et du brin « passager » qui lui est complémentaire, sera pris en charge, après internalisation dans la cellule, par le complexe RISC pour permettre au miARN mature libéré d'exercer son action régulatrice (344). Afin d'améliorer la stabilité vis-à-vis des nucléases, des modifications chimiques des bases nucléotidiques sont nécessaires, telles que l'introduction de bases 2'-fluorées (2'-F) (345). De plus, d'autres modifications chimiques au niveau des bases du brin passager sont également souvent effectuées, comme la modification 5'-O-méthyl (5'-OMe), pour favoriser sa dégradation et réduire ainsi les effets « off-target » (345–347). Cette stratégie comporte néanmoins un inconvénient majeur : la restauration de l'expression du miARN d'intérêt à un niveau supra-physiologique (348). L'emploi de vecteurs viraux de type AAV (Adeno-Associated-Virus) permet de pallier à ce désavantage en restaurant l'expression des miARN à des niveaux plus physiologiques (349–351). L'autre stratégie visant à restaurer le niveau d'expression d'un miARN est quant à elle basée sur l'utilisation de molécules

oligonucléotidiques antisens (« stratégie anti-miR »). Ces molécules correspondent à des séquences d'ARN simple brin et complémentaires du miARN mature qui sont capables d'induire sa séquestration au sein du complexe RISC, et par conséquent d'empêcher son interaction avec sa cible (351–355). Les anti-miR sont également modifiés chimiquement afin d'augmenter leur résistance *in vivo* vis-à-vis des nucléases ou améliorer leur spécificité (355,356). Cette approche fait actuellement l'objet de plusieurs essais cliniques chez l'Homme, en particulier le Lademirsén dirigé contre miR-21 pour le traitement du syndrome (Tableau 6)(334).

Tableau 6 : Etudes cliniques et pré-cliniques en cours basées sur la régulation de l'expression des miARN.

miARN	Stratégie	Pathologie	Statut	Industrie	Références
miR-17	Anti-miR	Maladie rénale polykystique	Phase I	Regulus Therapeutics	Lee et al., 2019(337)
miR-21	Anti-miR	Syndrome d'Alport	Phase II	Genzyme (Sanofi)	Chavez et al., 2022 (334)
miR-29	mimic	Fibrose cutanée	Phase II	miRagen Therapeutics	Gallant-Behm et al., 2019 (338)
miR-34a	mimic	Tumeurs solides	Phase I	MiRNA Therapeutics	Hong et al., 2020 (339)
miR-92a	Anti-miR	Ischémie	Phase I	miRagen Therapeutics	Abplanalp et al., 2020(340)
miR-122	Anti-miR	Hépatite C	Phase II	Santaris Pharma (Hoffmann-La Roche)	van der Ree et al., 2016 (341)
miR-155	Anti-miR	Lymphomes cutanés	Phase II	miRagen Therapeutics	Seto et al., 2018 (342)

Conclusion

L'essor de la biologie moléculaire dans l'étude des néphropathies a permis des avancées significatives dans la compréhension de leur pathogenèse et la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le développement des nouvelles techniques de séquençage et des progrès dans l'analyse bioinformatique constituent une avancée majeure aussi bien pour les laboratoires de biologie médicale en charge du diagnostic moléculaire que pour les unités de recherche impliquées dans l'identification de nouveaux déterminants moléculaires et cellulaires à l'origine des néphropathies. Nos travaux ont permis, d'une part, d'améliorer la connaissance de la nature de certains variants à l'origine d'une néphropathie héréditaire, en particulier les mutations introniques profondes et les variants structuraux, généralement non détectés par les techniques de génotypage couramment utilisées. D'autre part, ce travail de thèse a également permis d'identifier un microARN jouant potentiellement un rôle instrumental dans la toxicité rénale induite par le cisplatine. Sa modulation pharmacologique pourrait de ce fait permettre de limiter l'agression rénale tout en préservant l'efficacité des chimiothérapies à base de sels de platine.

Références

1. Peitzman SJ. Chapter 2 - From Bright's Disease to Chronic Kidney Disease. In: Kimmel PL, Rosenberg ME, éditeurs. *Chronic Renal Disease (Second Edition)* [Internet]. Academic Press; 2020 [cité 29 févr 2024]. p. 9-22. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128158760000024>
2. Harrison JH, Merrill JP, Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum*. 1956;6:432-6.
3. Opsahl JA, Abraham PA, Keane WF. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in chronic renal failure. *Drugs*. 1990;39 Suppl 2:23-32.
4. Korbet SM. Comparison of hemodialysis and peritoneal dialysis in the management of anemia related to chronic renal disease. *Semin Nephrol*. mars 1989;9(1 Suppl 1):9-15.
5. Voigts AL, Felsenfeld AJ, Llach F. The effects of calciferol and its metabolites on patients with chronic renal failure. II. Calcitriol, 1 alpha-hydroxyvitamin D3, and 24,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Intern Med*. juin 1983;143(6):1205-11.
6. Markell MS, Friedman EA. Diabetic nephropathy. Management of the end-stage patient. *Diabetes Care*. sept 1992;15(9):1226-38.
7. Kes P, Drusko D, Rupčić V. Cardiovascular complications in end-stage renal disease and hemodialysis patients. *Acta Medica Croat Cas Hrvatske Akad Med Znan*. 1996;50(4-5):199-208.
8. HAS. Haute Autorité de Santé. [cité 5 sept 2023]. Guide du parcours de soins – Maladie rénale chronique de l'adulte (MRC). Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3288950/fr/guide-du-parcours-de-soins-maladie-renale-chronique-de-l-adulte-mrc
9. Levey AS, Coresh J, Bolton K, Culleton B, Harvey KS, Ikizler TA, et al. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(2 SUPPL. 1):i-S266.
10. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, A[Combining Ring Above]sberg A, Powe NR, Romundstad S, et al. International Comparison of the Relationship of Chronic Kidney Disease Prevalence and ESRD Risk. *J Am Soc Nephrol*. août 2006;17(8):2275.
11. Hallan SI, Ritz E, Lydersen S, Romundstad S, Kvenild K, Orth SR. Combining GFR and albuminuria to classify CKD improves prediction of ESRD. *J Am Soc Nephrol JASN*. mai 2009;20(5):1069-77.
12. Lameire NH, Levin A, Kellum JA, Cheung M, Jadoul M, Winkelmayer WC, et al. Harmonizing acute and chronic kidney disease definition and classification: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int*. 1 sept 2021;100(3):516-26.
13. Bricker NS, Klahr S, Lubowitz H, Rieselbach RE. RENAL FUNCTION IN CHRONIC RENAL DISEASE. *Medicine (Baltimore)*. juill 1965;44(4):263.

14. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med.* 5 mai 2009;150(9):604-12.
15. Matsushita K, Mahmoodi BK, Woodward M, Emberson JR, Jafar TH, Jee SH, et al. Comparison of risk prediction using the CKD-EPI equation and the MDRD study equation for estimated glomerular filtration rate. *JAMA.* 9 mai 2012;307(18):1941-51.
16. Levey AS, Gansevoort RT, Coresh J, Inker LA, Heerspink HL, Grams ME, et al. Change in Albuminuria and GFR as End Points for Clinical Trials in Early Stages of CKD: A Scientific Workshop Sponsored by the National Kidney Foundation in Collaboration With the US Food and Drug Administration and European Medicines Agency. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* janv 2020;75(1):84-104.
17. Ix JH, Shlipak MG. The Promise of Tubule Biomarkers in Kidney Disease: A Review. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* nov 2021;78(5):719-27.
18. Rovin BH, Adler SG, Barratt J, Bridoux F, Burdge KA, Chan TM, et al. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int.* oct 2021;100(4):S1-276.
19. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 1 juin 2005;67(6):2089-100.
20. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One.* 2016;11(7):e0158765.
21. James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *The Lancet.* 10 avr 2010;375(9722):1296-309.
22. Shlipak MG, Tummalaipalli SL, Boulware LE, Grams ME, Ix JH, Jha V, et al. The case for early identification and intervention of chronic kidney disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 1 janv 2021;99(1):34-47.
23. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Lond Engl.* 29 févr 2020;395(10225):709-33.
24. Zhang L, Wang J, Yang CW, Tang SCW, Kashihara N, Kim YS, et al. International Society of Nephrology Global Kidney Health Atlas: structures, organization and services for the management of kidney failure in North and East Asia. *Kidney Int Suppl.* mai 2021;11(2):e77-85.
25. Wainstein M, Bello AK, Jha V, Harris DCH, Levin A, Gonzalez-Bedat MC, et al. International Society of Nephrology Global Kidney Health Atlas: structures, organization, and services for the management of kidney failure in Latin America. *Kidney Int Suppl.* mai 2021;11(2):e35-46.
26. Haute Autorité de Santé [Internet]. [cité 5 sept 2023]. Évaluation médico-économique des stratégies de prise en charge de l'insuffisance rénale chronique terminale en France. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_1775180/fr/evaluation-medico-

economique-des-strategies-de-prise-en-charge-de-l-insuffisance-renale-chronique-terminale-en-france

27. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, et al. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med.* 15 juill 2003;139(2):137-47.
28. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primer.* 23 nov 2017;3(1):17088.
29. Vivante A, Hildebrandt F. Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* mars 2016;12(3):133-46.
30. Alencar de Pinho N. Evaluation des pratiques cliniques dans la maladie rénale chronique – apport des études observationnelles [Internet] [These de doctorat]. Université Paris-Saclay (ComUE); 2019 [cité 5 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2019SACLS011>
31. O'Hare AM, Choi AI, Bertenthal D, Bacchetti P, Garg AX, Kaufman JS, et al. Age Affects Outcomes in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* oct 2007;18(10):2758.
32. Anders HJ, Huber TB, Isermann B, Schiffer M. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* juin 2018;14(6):361-77.
33. Ku E, Lee BJ, Wei J, Weir MR. Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis.* 1 juill 2019;74(1):120-31.
34. Mohiuddin M, Kooy RF, Pearson CE. De novo mutations, genetic mosaicism and human disease. *Front Genet.* 2022;13:983668.
35. Sullivan JA, Schoch K, Spillmann RC, Shashi V. Exome/Genome Sequencing in Undiagnosed Syndromes. *Annu Rev Med.* 27 janv 2023;74:489-502.
36. Boehm CD, Kazazian HH. The molecular basis of genetic disease. *Curr Opin Biotechnol.* déc 1990;1(2):180-7.
37. Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays Biochem.* 3 déc 2018;62(5):643-723.
38. Zhang F, Lupski JR. Non-coding genetic variants in human disease. *Hum Mol Genet.* 15 oct 2015;24(R1):R102-110.
39. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Chapman M, Evans K, Azevedo L, et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Hum Genet.* oct 2020;139(10):1197-207.
40. Guo C, McDowell IC, Nodzenski M, Scholtens DM, Allen AS, Lowe WL, et al. Transversions have larger regulatory effects than transitions. *BMC Genomics.* 19 mai 2017;18(1):394.
41. Maki H. Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu Rev Genet.* 2002;36:279-303.

42. Douville C, Masica DL, Stenson PD, Cooper DN, Gyax DM, Kim R, et al. Assessing the Pathogenicity of Insertion and Deletion Variants with the Variant Effect Scoring Tool (VEST-Indel). *Hum Mutat.* janv 2016;37(1):28-35.
43. Sung W, Ackerman MS, Dillon MM, Platt TG, Fuqua C, Cooper VS, et al. Evolution of the Insertion-Deletion Mutation Rate Across the Tree of Life. *G3 Bethesda Md.* 9 août 2016;6(8):2583-91.
44. Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet.* oct 2005;6(10):729-42.
45. Wheeler VC, Dion V. Modifiers of CAG/CTG Repeat Instability: Insights from Mammalian Models. *J Huntingt Dis.* 2021;10(1):123-48.
46. Xu P, Pan F, Roland C, Sagui C, Weninger K. Dynamics of strand slippage in DNA hairpins formed by CAG repeats: roles of sequence parity and trinucleotide interrupts. *Nucleic Acids Res.* 18 mars 2020;48(5):2232-45.
47. Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chrétien N, Tomé FM, et al. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet.* févr 1998;18(2):164-7.
48. Caburet S, Demarez A, Mourné L, Fellous M, De Baere E, Veitia RA. A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. *J Med Genet.* déc 2004;41(12):932-6.
49. Depienne C, Mandel JL. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet.* 6 mai 2021;108(5):764-85.
50. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics.* 3 nov 2008;1(1):4.
51. Kim S, Cho CS, Han K, Lee J. Structural Variation of Alu Element and Human Disease. *Genomics Inform.* sept 2016;14(3):70-7.
52. Mettananda S, Higgs DR. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* avr 2018;32(2):177-91.
53. McDermid HE, Morrow BE. Genomic disorders on 22q11. *Am J Hum Genet.* mai 2002;70(5):1077-88.
54. Suminaga R, Takeshima Y, Yasuda K, Shiga N, Nakamura H, Matsuo M. Non-homologous recombination between Alu and LINE-1 repeats caused a 430-kb deletion in the dystrophin gene: a novel source of genomic instability. *J Hum Genet.* 2000;45(6):331-6.
55. Payer LM, Burns KH. Transposable elements in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* déc 2019;20(12):760-72.
56. Kazazian HH, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature.* 10 mars 1988;332(6160):164-6.
57. Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, Férec C, Patrinos GP. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nat Rev Genet.* oct 2007;8(10):762-75.

58. Tayebi N, Stubblefield BK, Park JK, Orvisky E, Walker JM, LaMarca ME, et al. Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet.* mars 2003;72(3):519-34.
59. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.* janv 2001;2(1):21-32.
60. Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 févr 2014;6(2):a018382.
61. Butler MG. Prader-Willi Syndrome: Obesity due to Genomic Imprinting. *Curr Genomics.* mai 2011;12(3):204-15.
62. Zemet R, Van den Veyver IB, Stankiewicz P. Parental mosaicism for apparent de novo genetic variants: Scope, detection, and counseling challenges. *Prenat Diagn.* juin 2022;42(7):811-21.
63. Wood KA, Goriely A. The impact of paternal age on new mutations and disease in the next generation. *Fertil Steril.* déc 2022;118(6):1001-12.
64. Girard SL, Bourassa CV, Lemieux Perreault LP, Legault MA, Barhdadi A, Ambalavanan A, et al. Paternal Age Explains a Major Portion of De Novo Germline Mutation Rate Variability in Healthy Individuals. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164212.
65. Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Jabs EW. The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. *Am J Hum Genet.* oct 2003;73(4):939-47.
66. Vihinen M. Functional effects of protein variants. *Biochimie.* janv 2021;180:104-20.
67. Wilkie AO. The molecular basis of genetic dominance. *J Med Genet.* févr 1994;31(2):89-98.
68. Richards AJ, Snead MP. Molecular Basis of Pathogenic Variants in the Fibrillar Collagens. *Genes.* 4 juill 2022;13(7):1199.
69. Storoni S, Verdonk SJE, Zhytnik L, Pals G, Treurniet S, Elting MW, et al. From Genetics to Clinical Implications: A Study of 675 Dutch Osteogenesis Imperfecta Patients. *Biomolecules.* 2 févr 2023;13(2):281.
70. Li J, Parker B, Martyn C, Natarajan C, Guo J. The PMP22 gene and its related diseases. *Mol Neurobiol.* avr 2013;47(2):673-98.
71. Scott CF, Carrell RW, Glaser CB, Kueppers F, Lewis JH, Colman RW. Alpha-1-antitrypsin-Pittsburgh. A potent inhibitor of human plasma factor XIa, kallikrein, and factor XIIIf. *J Clin Invest.* févr 1986;77(2):631-4.
72. Hua B, Fan L, Liang Y, Zhao Y, Tuddenham EGD. Alpha1-antitrypsin Pittsburgh in a family with bleeding tendency. *Haematologica.* juin 2009;94(6):881-4.
73. Santoro M, Carlomagno F. Central role of RET in thyroid cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 déc 2013;5(12):a009233.

74. Caron P, Attié T, David D, Amiel J, Brousset F, Roger P, et al. C618R mutation in exon 10 of the RET proto-oncogene in a kindred with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* juill 1996;81(7):2731-3.
75. Monplaisir N, Merault G, Poyart C, Rhoda MD, Craescu C, Vidaud M, et al. Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1986;83(24):9363-7.
76. de Vooght KMK, van Wijk R, van Solinge WW. Management of gene promoter mutations in molecular diagnostics. *Clin Chem.* avr 2009;55(4):698-708.
77. Skelly DA, Ronald J, Akey JM. Inherited variation in gene expression. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:313-32.
78. Segert JA, Gisselbrecht SS, Bulyk ML. Transcriptional Silencers: Driving Gene Expression with the Brakes On. *Trends Genet TIG.* juin 2021;37(6):514-27.
79. Kleinjan DJ, van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet.* 1998;7(10):1611-8.
80. Nguyen HQ, Bosco G. Gene Positioning Effects on Expression in Eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 2015;49:627-46.
81. Lapidot M, Pilpel Y. Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO Rep.* déc 2006;7(12):1216-22.
82. Tufarelli C, Stanley JAS, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet.* juin 2003;34(2):157-65.
83. Latchman DS. Transcription-factor mutations and disease. *N Engl J Med.* 4 janv 1996;334(1):28-33.
84. Weaving LS, Ellaway CJ, Géczy J, Christodoulou J. Rett syndrome: clinical review and genetic update. *J Med Genet.* janv 2005;42(1):1-7.
85. Han J, Xiong J, Wang D, Fu XD. Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends Cell Biol.* juin 2011;21(6):336-43.
86. Singh R. RNA-protein interactions that regulate pre-mRNA splicing. *Gene Expr.* 2002;10(1-2):79-92.
87. Busch A, Hertel KJ. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3(1):1-12.
88. Lim KH, Ferraris L, Filloux ME, Raphael BJ, Fairbrother WG. Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 juill 2011;108(27):11093-8.
89. Anna A, Monika G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet.* août 2018;59(3):253-68.
90. Shoemaker CJ, Green R. Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol.* juin 2012;19(6):594-601.

91. Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S ichi, Wilson J, Reggin JD, et al. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet.* avr 2004;36(4):361-9.
92. Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:377-400.
93. Wallmeier J, Nielsen KG, Kuehni CE, Lucas JS, Leigh MW, Zariwala MA, et al. Motile ciliopathies. *Nat Rev Dis Primer.* 17 sept 2020;6(1):77.
94. Satir P. How Cilia Move. *Sci Am.* 1974;231(4):44-54.
95. Satir P. STUDIES ON CILIA: III. Further Studies on the Cilium Tip and a « Sliding Filament » Model of Ciliary Motility. *J Cell Biol.* 1 oct 1968;39(1):77-94.
96. Mitchell B, Jacobs R, Li J, Chien S, Kintner C. A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature.* mai 2007;447(7140):97-101.
97. Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reprod Camb Engl.* déc 2012;144(6):649-60.
98. Gerdes JM, Davis EE, Katsanis N. The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. *Cell.* 3 avr 2009;137(1):32-45.
99. Nigg EA, Raff JW. Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. *Cell.* 13 nov 2009;139(4):663-78.
100. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* mai 2010;11(5):331-44.
101. Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N Engl J Med.* 21 avr 2011;364(16):1533-43.
102. Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, Silbermann F, et al. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci.* 15 mai 2010;123(10):1785-95.
103. Takeda S, Yonekawa Y, Tanaka Y, Okada Y, Nonaka S, Hirokawa N. Left-Right Asymmetry and Kinesin Superfamily Protein KIF3A: New Insights in Determination of Laterality and Mesoderm Induction by *kif3A*^{-/-} Mice Analysis. *J Cell Biol.* 17 mai 1999;145(4):825-36.
104. Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* sept 2017;18(9):533-47.
105. Kiesel P, Alvarez Viar G, Tsoy N, Maraspini R, Gorilak P, Varga V, et al. The molecular structure of mammalian primary cilia revealed by cryo-electron tomography. *Nat Struct Mol Biol.* déc 2020;27(12):1115-24.
106. Wheatley DN, Wang AM, Strugnell GE. Expression of Primary Cilia in Mammalian Cells. *Cell Biol Int.* 1996;20(1):73-81.
107. Christensen ST, Pedersen LB, Schneider L, Satir P. Sensory Cilia and Integration of Signal Transduction in Human Health and Disease. *Traffic.* 2007;8(2):97-109.

108. Nachury MV, Mick DU. Establishing and regulating the composition of cilia for signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2019;20(7):389-405.
109. Wheatley DN. Primary Cilia in Normal and Pathological Tissues. *Pathobiology.* 8 oct 2008;63(4):222-38.
110. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol.* 2017;241(2):294-309.
111. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* févr 2003;33(2):129-37.
112. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation.* 4 mars 2008;117(9):1161-71.
113. Masyuk AI, Masyuk TV, LaRusso NF. CHOLANGIOCYTE PRIMARY CILIA IN LIVER HEALTH AND DISEASE. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* août 2008;237(8):2007-12.
114. Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear | *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [Internet]. [cité 20 mars 2024]. Disponible sur: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajprenal.1997.272.1.f132>
115. Latta H, Maunsbach AB, Madden SC. CILIA IN DIFFERENT SEGMENTS OF THE RAT NEPHRON. *J Biophys Biochem Cytol.* 1 oct 1961;11(1):248-52.
116. Bulger RE, Siegel FL, Pendergrass R. Scanning and transmission electron microscopy of the rat kidney. *Am J Anat.* avr 1974;139(4):483-501.
117. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK Cell Primary Cilium Increases Intracellular Calcium. *J Membr Biol.* 1 nov 2001;184(1):71-9.
118. Liu W, Murcia NS, Duan Y, Weinbaum S, Yoder BK, Schwiebert E, et al. Mechanoregulation of intracellular Ca²⁺ concentration is attenuated in collecting duct of monocilium-impaired orpk mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* nov 2005;289(5):F978-988.
119. Andrews PM. Scanning electron microscopy of human and rhesus monkey kidneys. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 1 mai 1975;32(5):510-8.
120. Sipos A, Vargas S, Peti-Peterdi J. Direct demonstration of tubular fluid flow sensing by macula densa cells. *Am J Physiol-Ren Physiol.* nov 2010;299(5):F1087-93.
121. Wang S, Livingston MJ, Su Y, Dong Z. Reciprocal regulation of cilia and autophagy via the MTOR and proteasome pathways. *Autophagy.* 3 avr 2015;11(4):607-16.
122. Berbari NF, O'Connor AK, Haycraft CJ, Yoder BK. The Primary Cilium as a Complex Signaling Center. *Curr Biol.* juill 2009;19(13):R526-35.
123. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation.* 4 mars 2008;117(9):1161-71.
124. Christensen ST, Clement CA, Satir P, Pedersen LB. Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling. *J Pathol.* 2012;226(2):172-84.

125. Ezratty EJ, Stokes N, Chai S, Shah AS, Williams SE, Fuchs E. A Role for the Primary Cilium in Notch Signaling and Epidermal Differentiation during Skin Development. *Cell*. 24 juin 2011;145(7):1129-41.
126. Seeger-Nukpezah T, Golemis EA. The extracellular matrix and ciliary signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 1 oct 2012;24(5):652-61.
127. Schou KB, Pedersen LB, Christensen ST. Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO Rep*. sept 2015;16(9):1099-113.
128. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science*. 20 juill 2007;317(5836):372-6.
129. Pedersen L, Schrøder J, Satir P, Christensen S. The Ciliary Cytoskeleton. *Compr Physiol*. 1 janv 2012;2:779-803.
130. Sorokin SP. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci*. 1 juin 1968;3(2):207-30.
131. Hoffman HK, Prekeris R. Roles of the actin cytoskeleton in ciliogenesis. *J Cell Sci*. 16 mai 2022;135(10):jcs259030.
132. Wu CT, Chen HY, Tang TK. Myosin-Va is required for preciliary vesicle transportation to the mother centriole during ciliogenesis. *Nat Cell Biol*. févr 2018;20(2):175-85.
133. Zhao H, Khan Z, Westlake CJ. Ciliogenesis membrane dynamics and organization. *Semin Cell Dev Biol*. 15 janv 2023;133:20-31.
134. Avasthi P, Marshall WF. Stages of ciliogenesis and regulation of ciliary length. *Differentiation*. 1 févr 2012;83(2):S30-42.
135. Spektor A, Tsang WY, Khoo D, Dynlacht BD. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell*. 24 août 2007;130(4):678-90.
136. Goetz SC, Liem KF, Anderson KV. The spinocerebellar ataxia-associated gene Tau tubulin kinase 2 controls the initiation of ciliogenesis. *Cell*. 9 nov 2012;151(4):847-58.
137. Kim S, Tsiokas L. Cilia and cell cycle re-entry. *Cell Cycle*. 15 août 2011;10(16):2683-90.
138. Pan J, Snell W. The Primary Cilium: Keeper of the Key to Cell Division. *Cell*. 29 juin 2007;129(7):1255-7.
139. Plotnikova OV, Golemis EA, Pugacheva EN. Cell Cycle–Dependent Ciliogenesis and Cancer. *Cancer Res*. 1 avr 2008;68(7):2058-61.
140. Deane JA, Cole DG, Seeley ES, Diener DR, Rosenbaum JL. Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr Biol CB*. 16 oct 2001;11(20):1586-90.
141. Anderson CT, Castillo AB, Brugmann SA, Helms JA, Jacobs CR, Stearns T. Primary Cilia: Cellular Sensors for the Skeleton. *Anat Rec*. 2008;291(9):1074-8.
142. Ou Y, Ruan Y, Cheng M, Moser JJ, Rattner JB, van der Hoorn FA. Adenylate cyclase regulates elongation of mammalian primary cilia. *Exp Cell Res*. 1 oct 2009;315(16):2802-17.

143. Kim J, Lee JE, Heynen-Genel S, Suyama E, Ono K, Lee K, et al. Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature*. avr 2010;464(7291):1048-51.
144. Cao J, Shen Y, Zhu L, Xu Y, Zhou Y, Wu Z, et al. miR-129-3p controls cilia assembly by regulating CP110 and actin dynamics. *Nat Cell Biol*. juill 2012;14(7):697-706.
145. Whole-genome screen identifies diverse pathways that negatively regulate ciliogenesis | *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. [cité 21 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.E20-02-0111>
146. Dawe HR, Adams M, Wheway G, Szymanska K, Logan CV, Noegel AA, et al. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 1 août 2009;122(15):2716-26.
147. Fan J, You L, Wang W, Huang W, Chu C, Chi Y, et al. Lamin A-mediated nuclear lamina integrity is required for proper ciliogenesis. *EMBO Rep*. 5 oct 2020;21(10):e49680.
148. Besschetnova TY, Kolpakova-Hart E, Guan Y, Zhou J, Olsen BR, Shah JV. Identification of Signaling Pathways Regulating Primary Cilium Length and Flow-Mediated Adaptation. *Curr Biol*. janv 2010;20(2):182-7.
149. Pala R, Alomari N, Nauli SM. Primary Cilium-Dependent Signaling Mechanisms. *Int J Mol Sci*. nov 2017;18(11):2272.
150. Jin H, White SR, Shida T, Schulz S, Aguiar M, Gygi SP, et al. The Conserved Bardet-Biedl Syndrome Proteins Assemble a Coat that Traffics Membrane Proteins to Cilia. *Cell*. 25 juin 2010;141(7):1208-19.
151. Vldar EK, Stratton MB, Saal ML, Salazar-De Simone G, Wang X, Wolgemuth D, et al. Cyclin-dependent kinase control of motile ciliogenesis. *Akhmanova A, Rajagopal J, Brody S, éditeurs. eLife*. 28 août 2018;7:e36375.
152. Fanconi G, Hanhart E, von ALBERTINI A, Uhlinger E, Dolivo G, Prader A. [Familial, juvenile nephronophthisis (idiopathic parenchymal contracted kidney)]. *Helv Paediatr Acta*. févr 1951;6(1):1-49.
153. Hildebrandt F, Waldherr R, Kutt R, Brandis M. The nephronophthisis complex: clinical and genetic aspects. *Clin Investig* [Internet]. sept 1992 [cité 27 mars 2024];70(9). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/BF00180751>
154. Hildebrandt F, Attanasio M, Otto E. Nephronophthisis: Disease Mechanisms of a Ciliopathy. *J Am Soc Nephrol JASN*. janv 2009;20(1):23-35.
155. Simms RJ, Hynes AM, Eley L, Sayer JA. Nephronophthisis: A Genetically Diverse Ciliopathy. *Int J Nephrol*. 15 mai 2011;2011:e527137.
156. Youn YH, Han YG. Primary Cilia in Brain Development and Diseases. *Am J Pathol*. 1 janv 2018;188(1):11-22.
157. SMITH CH, GRAHAM JB. CONGENITAL MEDULLARY CYSTS OF THE KIDNEYS WITH SEVERE REFRACTORY ANEMIA. *Am J Dis Child*. 1 juin 1945;69(6):369-77.
158. Hildebrandt F, Zhou W. Nephronophthisis-Associated Ciliopathies. *J Am Soc Nephrol*. juin 2007;18(6):1855.

-
159. Avner ED, Harmon W, Niaudet P, Niaudet P. *Pediatric Nephrology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2004. 1600 p.
160. Olinger E, Phakdeekitcharoen P, Caliskan Y, Orr S, Mabillard H, Pickles C, et al. Biallelic variants in TTC21B as a rare cause of early-onset arterial hypertension and tubuloglomerular kidney disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2022;190(1):109-20.
161. Srivastava S, Molinari E, Raman S, Sayer JA. Many Genes-One Disease? Genetics of Nephronophthisis (NPHP) and NPHP-Associated Disorders. *Front Pediatr*. 2017;5:287.
162. Marion V, Schlicht D, Mockel A, Caillard S, Imhoff O, Stoetzel C, et al. Bardet–Biedl syndrome highlights the major role of the primary cilium in efficient water reabsorption. *Kidney Int*. 1 mai 2011;79(9):1013-25.
163. Ahrabi AK, Terryn S, Valenti G, Caron N, Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, et al. PKD1 Haploinsufficiency Causes a Syndrome of Inappropriate Antidiuresis in Mice. *J Am Soc Nephrol*. juin 2007;18(6):1740.
164. Braun DA, Hildebrandt F. Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 mars 2017;9(3):a028191.
165. Tsang SH, Sharma T. *Atlas of Inherited Retinal Diseases*. Springer; 2018. 262 p.
166. Iorio P, Heidet L, Rutten C, Garcelon N, Audrézet MP, Morinière V, et al. The “salt and pepper” pattern on renal ultrasound in a group of children with molecular-proven diagnosis of ciliopathy-related renal diseases. *Pediatr Nephrol*. 1 juin 2020;35(6):1033-40.
167. Alpern RJ, Caplan MJ, Moe OW. Seldin and Giebisch's *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Academic Press; 2012. 3299 p.
168. Gunay-Aygun M. Liver and kidney disease in ciliopathies *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics - Wiley Online Library [Internet]*. 2009 [cité 5 mars 2024]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajmg.c.30225>
169. Mockel A, Perdomo Y, Stutzmann F, Letsch J, Marion V, Dollfus H. Retinal dystrophy in Bardet–Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Prog Retin Eye Res*. 1 juill 2011;30(4):258-74.
170. Sattar S, Gleeson JG. The ciliopathies in neuronal development: a clinical approach to investigation of Joubert syndrome and Joubert syndrome-related disorders. *Dev Med Child Neurol*. 2011;53(9):793-8.
171. Baker K, Beales PL. Making sense of cilia in disease: The human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009;151C(4):281-95.
172. Ware SM. Spectrum of Clinical Diseases Caused By Disorders of Primary Cilia | *Proceedings of the American Thoracic Society [Internet]*. 2011 [cité 5 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1513/pats.201103-025SD>
173. Huber C, Cormier-Daire V. Ciliary disorder of the skeleton. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2012;160C(3):165-74.
174. Niaudet P, Salomon R. [Nephronophthisis]. *Nephrol Ther*. sept 2006;2(4):200-6.
-

-
175. Redin C, Gras SL, Mhamdi O, Geoffroy V, Stoetzel C, Vincent MC, et al. Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alström Syndromes. *J Med Genet.* 1 août 2012;49(8):502-12.
176. Wolf MTF, Bonsib SM, Larsen CP, Hildebrandt F. Nephronophthisis: a pathological and genetic perspective. *Pediatr Nephrol [Internet].* 6 nov 2023 [cité 5 mars 2024]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00467-023-06174-8>
177. Gupta S, Ozimek-Kulik JE, Phillips JK. Nephronophthisis-Pathobiology and Molecular Pathogenesis of a Rare Kidney Genetic Disease. *Genes.* nov 2021;12(11):1762.
178. Halbritter J, Porath JD, Diaz KA, Braun DA, Kohl S, Chaki M, et al. Identification of 99 novel mutations in a worldwide cohort of 1,056 patients with a nephronophthisis-related ciliopathy. *Hum Genet.* 1 août 2013;132(8):865-84.
179. Hildebrandt F, Otto E, Rensing C, Nothwang HG, Vollmer M, Adolphs J, et al. A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat Genet.* oct 1997;17(2):149-53.
180. Konrad M, Saunier S, Heidet L, Silbermann F, Benessy F, Calado J, et al. Large Homozygous Deletions of the 2q13 Region Are a Major Cause of Juvenile Nephronophthisis. *Hum Mol Genet.* 1 mars 1996;5(3):367-71.
181. Saunier S, Calado J, Benessy F, Silbermann F, Heilig R, Weissenbach J, et al. Characterization of the NPHP1 Locus: Mutational Mechanism Involved in Deletions in Familial Juvenile Nephronophthisis. *Am J Hum Genet.* mars 2000;66(3):778-89.
182. Salomon R, Saunier S, Niaudet P. Nephronophthisis. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* déc 2009;24(12):2333-44.
183. Otto EA, Tory K, Attanasio M, Zhou W, Chaki M, Paruchuri Y, et al. Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11). *J Med Genet.* 1 oct 2009;46(10):663-70.
184. Bergmann C, Fliegau M, Brüche NO, Frank V, Olbrich H, Kirschner J, et al. Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am J Hum Genet.* avr 2008;82(4):959-70.
185. Olbrich H, Fliegau M, Hoefele J, Kispert A, Otto E, Volz A, et al. Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet.* août 2003;34(4):455-9.
186. Bullich G, Vargas I, Trujillano D, Mendizábal S, Piñero-Fernández JA, Fraga G, et al. Contribution of the TTC21B gene to glomerular and cystic kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 1 janv 2017;32(1):151-6.
187. Davis EE, Zhang Q, Liu Q, Diplas BH, Davey LM, Hartley J, et al. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nat Genet.* mars 2011;43(3):189-96.
188. Louie CM, Caridi G, Lopes VS, Brancati F, Kispert A, Lancaster MA, et al. AHI1 is required for photoreceptor outer segment development and is a modifier for retinal degeneration in nephronophthisis. *Nat Genet.* févr 2010;42(2):175-80.
-

-
189. Hoefele J, Wolf MTF, O'Toole JF, Otto EA, Schultheiss U, De[Combining Circumflex Accent]schenes G, et al. Evidence of Oligogenic Inheritance in Nephronophthisis. *J Am Soc Nephrol.* oct 2007;18(10):2789.
190. Penchev V, Boueva A, Kamenarova K, Roussinov D, Tzveova R, Ivanova M, et al. A familial case of severe infantile nephronophthisis explained by oligogenic inheritance. *Eur J Med Genet.* 1 juin 2017;60(6):321-5.
191. Tory K, Lacoste T, Burglen L, Morinière V, Boddaert N, Macher MA, et al. High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. *J Am Soc Nephrol JASN.* mai 2007;18(5):1566-75.
192. Parisi MA, Bennett CL, Eckert ML, Dobyns WB, Gleeson JG, Shaw DWW, et al. The NPHP1 Gene Deletion Associated with Juvenile Nephronophthisis Is Present in a Subset of Individuals with Joubert Syndrome. *Am J Hum Genet.* juill 2004;75(1):82-91.
193. Gubler MC, Heidet L, Antignac C. Syndrome d'Alport ou néphropathie héréditaire hématurique progressive avec surdité. *Néphrologie Thérapeutique.* 1 juin 2007;3(3):113-20.
194. Guthrie LeonardG. « IDIOPATHIC, » OR CONGENITAL, HEREDITARY AND FAMILY HÆMATURIA. *The Lancet.* 3 mai 1902;159(4105):1243-6.
195. Alport AC. HEREDITARY FAMILIAL CONGENITAL HAEMORRHAGIC NEPHRITIS. *Br Med J.* 19 mars 1927;1(3454):504-6.
196. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech.* mai 2008;71(5):357-70.
197. Cosgrove D, Liu S. Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* janv 2017;57-58:45-54.
198. Brown KL, Cummings CF, Vanacore RM, Hudson BG. Building collagen IV smart scaffolds on the outside of cells. *Protein Sci.* 2017;26(11):2151-61.
199. Sage H, Woodbury RG, Bornstein P. Structural studies on human type IV collagen. *J Biol Chem.* oct 1979;254(19):9893-900.
200. Kühn K. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol.* 1 févr 1995;14(6):439-45.
201. Kleppel MM, Santi PA, Cameron JD, Wieslander J, Michael AF. Human tissue distribution of novel basement membrane collagen. *Am J Pathol.* avr 1989;134(4):813-25.
202. Dölz R, Engel J, Kühn K. Folding of collagen IV. *Eur J Biochem.* 1988;178(2):357-66.
203. Johansson C, Butkowski R, Wieslander J. The structural organization of type IV collagen. Identification of three NC1 populations in the glomerular basement membrane. *J Biol Chem.* 5 déc 1992;267(34):24533-7.
204. Tsilibary EC, Charonis AS. The role of the main noncollagenous domain (NC1) in type IV collagen self-assembly. *J Cell Biol.* déc 1986;103(6 Pt 1):2467-73.
205. Söder S, Pöschl E. The NC1 domain of human collagen IV is necessary to initiate triple helix formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 3 déc 2004;325(1):276-80.
-

-
206. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem.* nov 1981;120(2):203-11.
207. Chu ML, Conway D, Pan TC, Baldwin C, Mann K, Deutzmann R, et al. Amino acid sequence of the triple-helical domain of human collagen type VI. *J Biol Chem.* 15 déc 1988;263(35):18601-6.
208. Némethy G, Scheraga HA. Stabilization of collagen fibrils by hydroxyproline. *Biochemistry.* 3 juin 1986;25(11):3184-8.
209. Traub W. Some Stereochemical Implications of the Molecular Conformation of Collagen. *Isr J Chem.* 1974;12(1-2):435-9.
210. Némethy G, Scheraga HA. Conformational preferences of amino acid side chains in collagen. *Biopolymers.* 1982;21(8):1535-55.
211. Salem G, Traub W. Conformational implications of amino acid sequence regularities in collagen. *FEBS Lett.* mars 1975;51(1-2):94-9.
212. Zhou J, Ding M, Zhao Z, Reeders ST. Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV). Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *J Biol Chem.* 6 mai 1994;269(18):13193-9.
213. Sakurai Y, Sullivan M, Yamada Y. Alpha 1 type IV collagen gene evolved differently from fibrillar collagen genes. *J Biol Chem.* 25 mai 1986;261(15):6654-7.
214. Exposito JY, Cluzel C, Garrone R, Lethias C. Evolution of collagens. *Anat Rec.* 2002;268(3):302-16.
215. Harvey SJ, Zheng K, Sado Y, Naito I, Ninomiya Y, Jacobs RM, et al. Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. *Kidney Int.* 1 janv 1998;54(6):1857-66.
216. Fallerini C, Dosa L, Tita R, Del Prete D, Feriozzi S, Gai G, et al. Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases. *Clin Genet.* 2014;86(3):252-7.
217. Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE, Hill CM, Smeets HJ, Doherty CC, et al. Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collagen alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol Dial Transplant.* 1 août 1997;12(8):1595-9.
218. Kalluri R, Weber M, Netzer KO, Sun MJ, Neilson EG, Hudson BG. COL4A5 gene deletion and production of post-transplant anti- α 3(IV) collagen alloantibodies in Alport syndrome. *Kidney Int.* 1 mars 1994;45(3):721-6.
219. Arrondel C, Deschênes G, Le Meur Y, Viau A, Cordonnier C, Fournier A, et al. A large tandem duplication within the COL4A5 gene is responsible for the high prevalence of Alport syndrome in French Polynesia. *Kidney Int.* 1 juin 2004;65(6):2030-40.
220. Renieri A, Seri M, Galli L, Cosci P, Imbasciati E, Massella L, et al. Small frameshift deletions within the COL4A5 gene in juvenile-onset Alport syndrome. *Hum Genet.* 1 oct 1993;92(4):417-20.
-

-
221. Furlano M, Martínez V, Pybus M, Arce Y, Crespi J, Venegas MDP, et al. Clinical and Genetic Features of Autosomal Dominant Alport Syndrome: A Cohort Study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* oct 2021;78(4):560-570.e1.
222. Gibson JT, Huang M, Shenelli Croos Dabrera M, Shukla K, Rothe H, Hilbert P, et al. Genotype–phenotype correlations for COL4A3–COL4A5 variants resulting in Gly substitutions in Alport syndrome. *Sci Rep.* 17 févr 2022;12(1):2722.
223. Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* juill 2002;17(7):1218-27.
224. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, Marchi MD, Rizzoni G, Renieri A, et al. X-linked Alport Syndrome: Natural History in 195 Families and Genotype- Phenotype Correlations in Males. *J Am Soc Nephrol.* avr 2000;11(4):649.
225. Wang YF, Ding J, Wang F, Bu DF. Effect of glycine substitutions on $\alpha 5(\text{IV})$ chain structure and structure–phenotype correlations in Alport syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 avr 2004;316(4):1143-9.
226. Gregory MC, Terreros DA, Barker DF, Fain PN, Denison JC, Atkin CL. Alport Syndrome – Clinical Phenotypes, Incidence, and Pathology^{1,2}. 14 mars 1996 [cité 13 mars 2024]; Disponible sur: <https://karger.com/books/book/2229/chapter/5717547/Alport-Syndrome-Clinical-Phenotypes-Incidence-and>
227. Gregory MC. Alport's Syndrome. In: Andreucci VE, Fine LG, éditeurs. *International Yearbook of Nephrology 1993* [Internet]. London: Springer; 1992 [cité 13 mars 2024]. p. 143-56. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4471-1948-7_8
228. Adone A, Anjankar A. Alport Syndrome: A Comprehensive Review. *Cureus.* oct 2023;15(10):e47129.
229. Savige J, Huang M, Croos Dabrera MS, Shukla K, Gibson J. Genotype-Phenotype Correlations for Pathogenic COL4A3–COL4A5 Variants in X-Linked, Autosomal Recessive, and Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Front Med* [Internet]. 6 mai 2022 [cité 13 mars 2024];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.865034>
230. Rheault MN, Kren SM, Hartich LA, Wall M, Thomas W, Mesa HA, et al. X-inactivation modifies disease severity in female carriers of murine X-linked Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 1 mars 2010;25(3):764-9.
231. Savige J. Heterozygous Pathogenic COL4A3 and COL4A4 Variants (Autosomal Dominant Alport Syndrome) Are Common, and Not Typically Associated With End-Stage Kidney Failure, Hearing Loss, or Ocular Abnormalities. *Kidney Int Rep.* 7 juin 2022;7(9):1933-8.
232. Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo Nigro C, et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet.* sept 2000;26(1):103-5.
233. Arrondel C, Vodovar N, Knebelmann B, Grünfeld JP, Gubler MC, Antignac C, et al. Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes. *J Am Soc Nephrol JASN.* janv 2002;13(1):65-74.
-

-
234. Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG. Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest.* 15 mai 1997;99(10):2470-8.
235. Xie J, Wu X, Ren H, Wang W, Wang Z, Pan X, et al. COL4A3 mutations cause focal segmental glomerulosclerosis. *J Mol Cell Biol.* 1 déc 2014;6(6):498-505.
236. Papazachariou L, Demosthenous P, Pieri M, Papagregoriou G, Savva I, Stavrou C, et al. Frequency of COL4A3/COL4A4 Mutations amongst Families Segregating Glomerular Microscopic Hematuria and Evidence for Activation of the Unfolded Protein Response. Focal and Segmental Glomerulosclerosis Is a Frequent Development during Ageing. *PLOS ONE.* 16 déc 2014;9(12):e115015.
237. Heidet L, Gubler MC. [Alport syndrome: Hereditary nephropathy associated with mutations in genes coding for type IV collagen chains]. *Nephrol Ther.* déc 2016;12(7):544-51.
238. Haas M. Alport Syndrome and Thin Glomerular Basement Membrane Nephropathy: A Practical Approach to Diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1 févr 2009;133(2):224-32.
239. Soderland P, Lovekar S, Weiner DE, Brooks DR, Kaufman JS. Chronic Kidney Disease Associated With Environmental Toxins and Exposures. *Adv Chronic Kidney Dis.* 1 mai 2010;17(3):254-64.
240. Kazancioğlu R. Risk factors for chronic kidney disease: an update. *Kidney Int Suppl.* 1 déc 2013;3(4):368-71.
241. Kauffman GB, Pentimalli R, Doldi (1908-2001) S, Hall MD. Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. *Platin Met Rev.* 1 oct 2010;54(4):250-6.
242. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature.* 13 févr 1965;205:698-9.
243. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 26 avr 1969;222(5191):385-6.
244. Lippman AJ, Helson C, Helson L, Krakoff IH. Clinical trials of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother Rep.* avr 1973;57(2):191-200.
245. Scagliotti GV, Parikh P, Von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 20 juill 2008;26(21):3543-51.
246. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* août 2007;7(8):573-84.
247. Rosenberg B. Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Naturwissenschaften.* sept 1973;60(9):399-406.
-

-
248. Macciò A, Madeddu C. Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy – from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opin Pharmacother.* 1 sept 2013;14(13):1839-57.
249. Jordan P, Carmo-Fonseca* M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 1 août 2000;57(8):1229-35.
250. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* avr 2012;31(15):1869-83.
251. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni E, Olivetto E, et al. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Oncol Rep.* 1 avr 2013;29(4):1285-92.
252. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins.* nov 2010;2(11):2490-518.
253. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* mai 2008;73(9):994-1007.
254. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated Cell Death in AKI. *J Am Soc Nephrol.* déc 2014;25(12):2689.
255. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology. *Science.* 11 avr 2003;300(5617):286-90.
256. Imanishi T, Itoh T, Suzuki Y, O'Donovan C, Fukuchi S, Koyanagi KO, et al. Integrative Annotation of 21,037 Human Genes Validated by Full-Length cDNA Clones. *PLoS Biol.* juin 2004;2(6):e162.
257. Feingold EA, Good PJ, Guyer MS, Kamholz S, Liefer L, Wetterstrand K, et al. The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) Project. *SCIENCE.* oct 2004;306(5696):636-40.
258. de Souza N. The ENCODE project. *Nat Methods.* nov 2012;9(11):1046-1046.
259. Amin N, McGrath A, Chen YPP. Evaluation of deep learning in non-coding RNA classification. *Nat Mach Intell.* mai 2019;1(5):246-56.
260. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 1 janv 2009;19(1):92-105.
261. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 19 févr 1998;391(6669):806-11.
262. Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell.* 27 avr 2012;149(3):515-24.
263. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol.* 2011;8(5):706-13.
264. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA.* 3 janv 2005;11(3):241-7.
-

-
265. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2 sept 2002;21(17):4663-70.
266. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N Y N.* déc 2004;10(12):1957-66.
267. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 11 nov 2004;432(7014):231-5.
268. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science.* 27 nov 2009;326(5957):1275-9.
269. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* nov 2003;35(3):215-7.
270. Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, et al. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature.* 13 juill 2011;475(7355):201-5.
271. Liu X, Jin DY, McManus MT, Mourelatos Z. Precursor microRNA-programmed silencing complex assembly pathways in mammals. *Mol Cell.* 25 mai 2012;46(4):507-17.
272. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* juill 2015;16(7):421-33.
273. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 15 oct 2008;22(20):2773-85.
274. Yang JS, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell.* 16 sept 2011;43(6):892-903.
275. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* févr 2011;12(2):99-110.
276. Agarwal, Gw B, Jw N, Dp B. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* [Internet]. 8 déc 2015 [cité 24 janv 2023];4. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26267216/>
277. Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA N Y N.* août 2009;15(8):1433-42.
278. Passmore LA, Coller J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2022;23(2):93-106.
279. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 1 déc 2009;7(4):147-54.
280. Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G. MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nat Rev Nephrol.* janv 2015;11(1):23-33.
281. Zhao H, Ma SX, Shang YQ, Zhang HQ, Su W. microRNAs in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta.* 1 avr 2019;491:59-65.
-

-
282. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 29 juin 2007;129(7):1401-14.
283. Rubel D, Boulanger J, Craciun F, Xu EY, Zhang Y, Phillips L, et al. Anti-microRNA-21 Therapy on Top of ACE Inhibition Delays Renal Failure in Alport Syndrome Mouse Models. *Cells*. 9 févr 2022;11(4):594.
284. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest*. janv 2015;125(1):141-56.
285. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. mai 2015;17(5):405-24.
286. Corapi KM, Chen JLT, Balk EM, Gordon CE. Bleeding Complications of Native Kidney Biopsy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 1 juill 2012;60(1):62-73.
287. Bataille S, Jourde N, Daniel L, Mondain JR, Faure M, Gobert P, et al. Comparative Safety and Efficiency of Five Percutaneous Kidney Biopsy Approaches of Native Kidneys: A Multicenter Study. *Am J Nephrol*. 2012;35(5):387-93.
288. Morinière V, Dahan K, Hilbert P, Lison M, Lebbah S, Topa A, et al. Improving Mutation Screening in Familial Hematuric Nephropathies through Next Generation Sequencing. *J Am Soc Nephrol*. déc 2014;25(12):2740.
289. Gubler MC. Diagnosis of Alport syndrome without biopsy? *Pediatr Nephrol*. 1 mai 2007;22(5):621-5.
290. Sun Y, Liu F, Fan C, Wang Y, Song L, Fang Z, et al. Characterizing sensitivity and coverage of clinical WGS as a diagnostic test for genetic disorders. *BMC Med Genomics*. 13 avr 2021;14(1):102.
291. Oh GS, Kim HJ, Shen A, Lee SB, Khadka D, Pandit A, et al. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolytes Blood Press E BP*. déc 2014;12(2):55-65.
292. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol*. 1 mai 2009;61(3):223-42.
293. Ambros V. The evolution of our thinking about microRNAs. *Nat Med*. oct 2008;14(10):1036-40.
294. Port M, Glaesener S, Ruf C, Riecke A, Bokemeyer C, Meineke V, et al. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines. *Mol Cancer*. 15 mai 2011;10:52.
295. Peyrou M, Hanna PE, Cribb AE. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. sept 2007;99(1):346-53.
296. Adams M, Kerby IJ, Rocker I, Evans A, Johansen K, Franks CR. A Comparison of the Toxicity and Efficacy of Cisplatin and Carboplatin in Advanced Ovarian Cancer. *Acta Oncol*. 1 janv 1989;28(1):57-60.
-

-
297. Mahtal N, Lenoir O, Tinel C, Anglicheau D, Tharaux PL. MicroRNAs in kidney injury and disease. *Nat Rev Nephrol.* oct 2022;18(10):643-62.
298. Larrue R, Fellah S, Van der Hauwaert C, Hennino MF, Perrais M, Lionet A, et al. The Versatile Role of miR-21 in Renal Homeostasis and Diseases. *Cells.* janv 2022;11(21):3525.
299. Pavkovic M, Robinson-Cohen C, Chua AS, Nicoara O, Cárdenas-González M, Bijol V, et al. Detection of Drug-Induced Acute Kidney Injury in Humans Using Urinary KIM-1, miR-21, -200c, and -423. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* juill 2016;152(1):205-13.
300. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* déc 2001;25(4):402-8.
301. Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol.* févr 2018;31(1):15-25.
302. Oh DY, Walenta E, Akiyama TE, Lagakos WS, Lackey D, Pessentheiner AR, et al. A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med.* août 2014;20(8):942-7.
303. Tu H, Sun H, Lin Y, Ding J, Nan K, Li Z, et al. Oxidative Stress Upregulates PDCD4 Expression in Patients with Gastric Cancer via miR-21. *Curr Pharm Des.* 1 avr 2014;20(11):1917-23.
304. Calo N, Ramadori P, Sobolewski C, Romero Y, Maeder C, Fournier M, et al. Stress-activated *miR-21/miR-21** in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. *Gut.* nov 2016;65(11):1871-81.
305. Glowacki F, Savary G, Gnemmi V, Buob D, Hauwaert CV der, Lo-Guidice JM, et al. Increased Circulating miR-21 Levels Are Associated with Kidney Fibrosis. *PLOS ONE.* 28 févr 2013;8(2):e58014.
306. Pfeffer SR, Yang CH, Pfeffer LM. The Role of miR-21 in Cancer. *Drug Dev Res.* sept 2015;76(6):270-7.
307. Zhong X, Chung ACK, Chen HY, Meng XM, Lan HY. Smad3-Mediated Upregulation of miR-21 Promotes Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* sept 2011;22(9):1668.
308. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, et al. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res.* 1 août 2010;87(3):431-9.
309. Cheng Y, Zhang C. MicroRNA-21 in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 1 juin 2010;3(3):251-5.
310. Xu X, Kriegel AJ, Jiao X, Liu H, Bai X, Olson J, et al. miR-21 in ischemia/reperfusion injury: a double-edged sword? *Physiol Genomics.* nov 2014;46(21):789-97.
311. Lange T, Artelt N, Kindt F, Stracke S, Rettig R, Lendeckel U, et al. MiR-21 is up-regulated in urinary exosomes of chronic kidney disease patients and after glomerular injury. *J Cell Mol Med.* juill 2019;23(7):4839-43.
-

-
312. Hennino MF, Buob D, Van der Hauwaert C, Gnemmi V, Jomaa Z, Pottier N, et al. miR-21-5p renal expression is associated with fibrosis and renal survival in patients with IgA nephropathy. *Sci Rep.* 6 juin 2016;6(1):27209.
313. Van Der Hauwaert C, Hennino MF, Vandebussche C, Dewaeles E, Gnemmi V, Savary G, et al. Implication de miR-21 dans les agressions rénales. *Néphrologie Thérapeutique.* 1 sept 2018;14(5):410.
314. Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, Linn G, et al. MicroRNA-21 Promotes Fibrosis of the Kidney by Silencing Metabolic Pathways. *Sci Transl Med [Internet].* 15 févr 2012 [cité 15 mars 2024];4(121). Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3003205>
315. Katsanis SH, Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet.* juin 2013;14(6):415-26.
316. Groopman EE, Rasouly HM, Gharavi AG. Genomic medicine for kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* févr 2018;14(2):83-104.
317. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, Petrovski S, Aggarwal VS, Milo-Rasouly H, et al. Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *N Engl J Med.* 10 janv 2019;380(2):142-51.
318. Knoers N, Antignac C, Bergmann C, Dahan K, Giglio S, Heidet L, et al. Genetic testing in the diagnosis of chronic kidney disease: recommendations for clinical practice. *Nephrol Dial Transplant.* 1 févr 2022;37(2):239-54.
319. Connaughton DM, Kennedy C, Shril S, Mann N, Murray SL, Williams PA, et al. Monogenic causes of chronic kidney disease in adults. *Kidney Int.* 1 avr 2019;95(4):914-28.
320. Connaughton DM, Hildebrandt F. Personalized medicine in chronic kidney disease by detection of monogenic mutations. *Nephrol Dial Transplant.* 1 mars 2020;35(3):390-7.
321. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell.* 26 sept 2013;155(1):27-38.
322. Dijk EL van, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 1 sept 2014;30(9):418-26.
323. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clin Chem.* 1 avr 2009;55(4):641-58.
324. Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, Collins RL, Kanai M, Wang Q, et al. A genomic mutational constraint map using variation in 76,156 human genomes. *Nature.* 4 janv 2024;625(7993):92-100.
325. Manrai AK, Funke BH, Rehm HL, Olesen MS, Maron BA, Szolovits P, et al. Genetic Misdiagnoses and the Potential for Health Disparities. *N Engl J Med.* 18 août 2016;375(7):655-65.
326. Walsh N, Cooper A, Dockery A, O'Byrne JJ. Variant reclassification and clinical implications. *J Med Genet.* 31 janv 2024;jmg-2023-109488.

327. Abyzov A, Urban AE, Snyder M, Gerstein M. CNVnator: An approach to discover, genotype, and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing. *Genome Res.* 6 janv 2011;21(6):974-84.
328. Pös O, Radvanszky J, Buglyó G, Pös Z, Rusnakova D, Nagy B, et al. DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. *Biomed J.* 1 oct 2021;44(5):548-59.
329. Lindstrand A, Davis EE, Carvalho CMB, Pehlivan D, Willer JR, Tsai IC, et al. Recurrent CNVs and SNVs at the NPHP1 Locus Contribute Pathogenic Alleles to Bardet-Biedl Syndrome. *Am J Hum Genet.* mai 2014;94(5):745-54.
330. Anikster Y, Lucero C, Touchman JW, Huizing M, McDowell G, Shotelersuk V, et al. Identification and Detection of the Common 65-kb Deletion Breakpoint in the Nephropathic Cystinosis Gene (*CTNS*). *Mol Genet Metab.* 1 févr 1999;66(2):111-6.
331. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2018;141(4):1202-7.
332. Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov.* août 2014;13(8):622-38.
333. Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res.* juin 2016;7(2):68.
334. Chavez E, Rodriguez J, Drexler Y, Fornoni A. Novel Therapies for Alport Syndrome. *Front Med.* 25 avr 2022;9:848389.
335. Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A, Liu G. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *Am J Physiol-Ren Physiol.* oct 2011;301(4):F793-801.
336. Liu L, Wang Y, Yan R, Liang L, Zhou X, Liu H, et al. BMP-7 inhibits renal fibrosis in diabetic nephropathy via miR-21 downregulation. *Life Sci.* 1 déc 2019;238:116957.
337. Lee EC, Valencia T, Allerson C, Schairer A, Flaten A, Yheskel M, et al. Discovery and preclinical evaluation of anti-miR-17 oligonucleotide RGLS4326 for the treatment of polycystic kidney disease. *Nat Commun.* 12 sept 2019;10(1):4148.
338. Gallant-Behm CL, Piper J, Lynch JM, Seto AG, Hong SJ, Mustoe TA, et al. A MicroRNA-29 Mimic (Replarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin. *J Invest Dermatol.* mai 2019;139(5):1073-81.
339. Hong DS, Kang YK, Borad M, Sachdev J, Ejadi S, Lim HY, et al. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer.* mai 2020;122(11):1630-7.
340. Abplanalp WT, Fischer A, John D, Zeiher AM, Gosgnach W, Darville H, et al. Efficiency and Target Derepression of Anti-miR-92a: Results of a First in Human Study. *Nucleic Acid Ther.* déc 2020;30(6):335-45.
341. van der Ree MH, van der Meer AJ, van Nuenen AC, de Bruijne J, Ottosen S, Janssen HL, et al. Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(1):102-13.

-
342. Seto AG, Beatty X, Lynch JM, Hermreck M, Tetzlaff M, Duvic M, et al. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2018;183(3):428-44.
343. van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. Toward MicroRNA-Based Therapeutics for Heart Disease - the sense in antisense. *Circ Res.* 24 oct 2008;103(9):919-28.
344. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 6 sept 2002;110(5):563-74.
345. Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA.* sept 2003;9(9):1034-48.
346. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA.* juill 2006;12(7):1197-205.
347. Chen PY, Weinmann L, Gaidatzis D, Pei Y, Zavolan M, Tuschl T, et al. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA.* févr 2008;14(2):263-74.
348. Bramsen JB, Laursen MB, Nielsen AF, Hansen TB, Bus C, Langkjær N, et al. A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 1 mai 2009;37(9):2867-81.
349. Adriaansen J, Vervoordeldonk MJB, Tak PP. Gene therapy as a therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis: innovative vectors and therapeutic genes. *Rheumatol Oxf Engl.* juin 2006;45(6):656-68.
350. Aalbers CJ, Tak PP, Vervoordeldonk MJ. Advancements in adeno-associated viral gene therapy approaches: exploring a new horizon. *F1000 Med Rep.* 1 sept 2011;3:17.
351. van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med.* juill 2014;6(7):851-64.
352. Obad S, dos Santos CO, Petri A, Heidenblad M, Broom O, Ruse C, et al. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat Genet.* 20 mars 2011;43(4):371-8.
353. Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence.* 9 janv 2012;3:1.
354. Pottier N, Cauffiez C, Perrais M, Barbry P, Mari B. FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 1 mars 2014;35(3):119-26.
355. Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu Rev Med.* 2019;70(1):307-21.
356. Bennett CF, Baker BF, Pham N, Swayze E, Geary RS. Pharmacology of Antisense Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 6 janv 2017;57:81-105.

Annexes

ANNEXE 1 **109**

Diagnostic utility of whole-genome sequencing for nephronophthisis

Larrue R, Chamley P, Bardyn T, Lionet A, Gnemmi V, Cauffiez C, Glowacki F, Pottier N, Broly F. NPJ genomic medicine, 2020, vol. 5, no 1, p. 38.

ANNEXE 2 **115**

Whole-genome sequencing revealed a novel structural variant in COL4A4 causing autosomal dominant Alport syndrome

Clément D, Andreani M, Boukrout N, Perrais M, Lefebvre B, Cauffiez C, Pottier N, Larrue R.

ANNEXE 3 **123**

Pervasive role of the long noncoding RNA DNMT3OS in development and diseases.

Fellah S*, Larrue R*, Truchi M, Vassaux G, Mari B, Cauffiez C, Pottier N. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2023, vol. 14, no 2, p. e1736.

ANNEXE 4 **141**

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

Larrue R., Fellah S., Van der Hauwaert C., Hennino MF., Perrais M., Lionet A., Glowacki F., Pottier N., Cauffiez C. Cells, 2022, vol. 11, no 21, p. 3525.

ANNEXE 5 **155**

miR-92a-3p regulates cisplatin-induced cancer cell death

Larrue R, Fellah S, Boukrout N, De Sousa C, Lemaire J, Leboeuf C, Gougeon M, Perrais M, Cauffiez C, Pottier N, Van der Hauwaert C. Cell Death & Disease, 2023, vol. 14, no 9, p. 603.

CASE REPORT OPEN



Diagnostic utility of whole-genome sequencing for nephronophthisis

Romain Larrue^{1,2}, Paul Chamley³, Thomas Bardyn¹, Arnaud Lionet³, Viviane Gnemmi^{2,4}, Christelle Cauffiez², François Glowacki^{2,3}, Nicolas Pottier^{1,2,5} and Franck Broly^{1,5}

Next-generation sequencing has revolutionized the molecular diagnosis of individuals affected by genetic kidney diseases. Indeed, rapid genetic testing in individuals with suspected inherited nephropathy has not only important implications for diagnosis and prognosis but also for genetic counseling. Nephronophthisis (NPHP) and related syndromes, a leading cause of end-stage renal failure, are autosomal recessive disorders characterized by the variable presentation and considerable locus heterogeneity with more than 90 genes described as single-gene causes. In this case report, we demonstrate the utility of whole-genome sequencing (WGS) for the molecular diagnosis of NPHP by identifying two putative disease-causing intronic mutations in the *NPHP3* gene, including one deep intronic variant. We further show that both intronic variants, by affecting splicing, result in a truncated nephrocystin-3 protein. This study provides a framework for applying WGS as a first-line diagnostic tool for highly heterogeneous disease such as NPHP and further suggests that deep intronic variations are an important underestimated cause of monogenic disorders.

npj Genomic Medicine (2020)5:38; <https://doi.org/10.1038/s41525-020-00147-8>

INTRODUCTION

Ciliopathies represent an expanding group of heterogeneous inherited diseases primarily caused by defects in the cilium-centrosome complex^{1,2}. These organelles are central to the perception of the physical environment by sensing various extracellular signals, such as growth factors, chemicals, light, and fluid flow, and are thus critical for the normal function of multiple organ systems^{1,2}. Consequently, ciliary dysfunction results in a myriad of phenotypes, ranging from cystic kidney diseases and blindness to neurologic phenotypes, obesity, and diabetes^{1,2}.

Nephronophthisis (NPHP [MIM: PS256100]), a rare autosomal recessive cystic kidney disease caused by mutations in genes coding for cilia-associated nephrocystin proteins, is the leading genetic cause of end-stage renal failure in the first three decades of life¹⁻³. Distinct age-based clinical subtypes are recognized: infantile, juvenile, and adolescent/adult forms, according to the age of onset of renal failure³. To date, >90 genes, including *NPHP1* (MIM: 607100) to *NPHP4* (MIM:607215), have been identified that cause NPHP and related syndromes when mutated^{2,4}. At the kidney level, NPHP is characterized by an impaired renal concentrating ability, chronic tubulointerstitial nephritis, renal corticomedullary cyst formation, and progression to ESRD usually occurs before the age of 30^{2,3}. As a result, renal manifestations of NPHP typically include polyuria, polydipsia with regular fluid intake at night, secondary enuresis, without evidence of proteinuria, hematuria, or cellular elements until late stage^{2,3}. While in the majority of patients, NPHP occurs as an isolated kidney disease, ~10–20% NPHP-affected individuals have additional extrarenal manifestations, such as retinal degeneration, liver fibrosis as well as skeletal, neurological, and cardiac defects¹⁻³.

As clinical presentation of NPHP is frequently unspecific and overlap with many other kidney diseases, accurate and timely diagnosis is essential for the clinical management of patients and

genetic counseling^{1,2}. Nevertheless, establishing the genetic cause of NPHP is only possible in <50% of patients^{5,6}. The rapid development and application of high-throughput sequencing technologies now enable the screening of the entire genome and the identification of nearly all forms of genetic variations⁷. In this work, we report a family affected by NPHP and demonstrate the diagnostic utility of whole-genome sequencing (WGS) in particular to identify deep intronic disease-causing mutations.

RESULTS

Clinical description

In this report, we describe the case of a 30-year-old patient who presented nephronophthisis with liver injury in a brotherhood of three children (Fig. 1).

At the age of nine, the proband, previously asymptomatic, presented chronic asthenia. Initial blood tests revealed anemia and terminal chronic kidney disease (CKD). Proteinuria showed a tubulointerstitial profile. Renal ultrasound imaging indicated increased echogenicity with loss of corticomedullary differentiation and identified a single cyst at the upper pole of the left kidney. No renal biopsy was performed due to the advanced stage of the disease. The fundus examination showed drusen, which remained stable during ophthalmological follow-up. Initial liver function tests showed biological cholestasis, but transaminase and bilirubin levels remained within a normal range. Genetic analysis of *NPHP1*, the only gene for which molecular testing was available at that time, was normal, and the nephropathy was thus classified as NPHP of unknown genetic origin. Renal replacement therapy was initiated with the peritoneal disease shortly after diagnosis. First kidney transplantation was performed at the age of 12, but the patient returned to hemodialysis at the age of 20, while cholestasis remained stable. At age 24, as serum transaminase levels started to

¹Service de Toxicologie et Génopathies, CHU Lille, F-59000 Lille, France. ²Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020- UMR-S 1277, F-59000 Lille, France. ³Service de Néphrologie, CHU Lille, F-59000 Lille, France. ⁴Service d'Anatomo-pathologie, CHU Lille, F-59000 Lille, France. ⁵These authors contributed equally: Nicolas Pottier, Franck Broly. ✉email: nicolas.pottier@chru-lille.fr

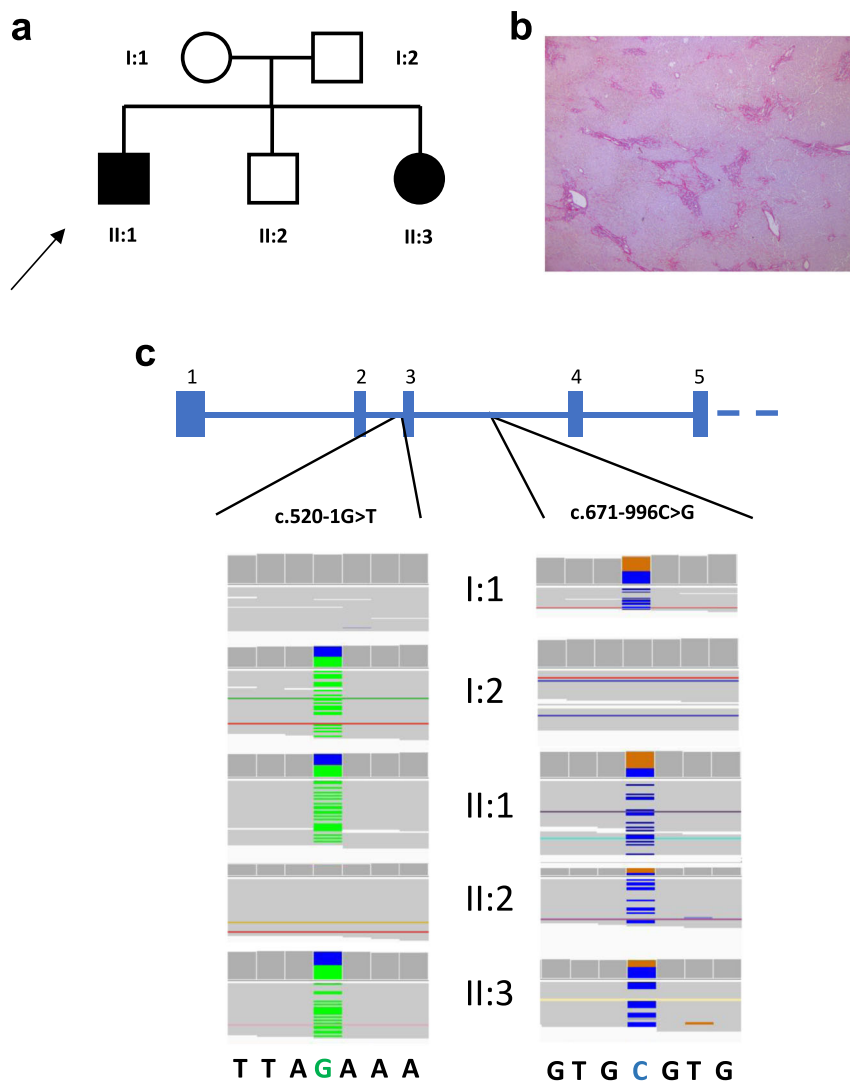


Fig. 1 Family description. **a** Pedigree. Both individuals II:1 and II:3 are affected by NPHP. Arrow indicates the proband. **b** Representative liver section of the proband showing periportal fibrosis (Sirius Red; x20 magnification). **c** All family members were subjected to genetic analysis. Zoomed in Integrative Genomics Viewer (IGV) screenshots showing the distribution of the two pathogenic mutations identified in *NPHP3* by whole-genome sequencing (WGS) for each family member.

rise, liver biopsies were performed and showed extensive fibrosis with ductular neogenesis (Fig. 1b). Liver function progressively worsened, and patient finally received a combined kidney–liver transplantation. Follow-up showed favorable results with normal liver function and a mean creatinine level of 1.4 mg/dL.

His younger sister was medically followed since the age of 4. Blood samples were normal, and kidney ultrasound showed hyperechogenic kidneys. At age 5, fundus examination also showed macular drusen. At age 10, her kidney function decreased rapidly leading to terminal CKD the following year. She benefited from preemptive kidney transplantation at age 12. She is now 23 years old, and follow-up shows a normal liver function.

Their younger brother, who is now 28 years of age, has also been evaluated, but shows no sign of kidney, liver, or macular disease.

Molecular analysis

A peripheral blood sample was collected from the proband (II:1), and genomic DNA was extracted. Genetic testing for NPHP was initially carried out using a dedicated targeted Next-generation sequencing (NGS) panel designed to capture the coding regions

and the exon–intron boundaries of 25 genes associated with NPHP. A total of 272 variants were reviewed, and only one heterozygous mutation affecting the *NPHP3* gene (MIM:608002; RefSeq NM_153240.4) was categorized as “pathogenic” according to ACMG guidelines⁸ (Fig. 1). The remaining mutations were classified as variants of unknown significance, likely benign, or benign. This putative disease-causing variant was located in the canonical splice region of the second intron of the *NPHP3* gene at the position –1 of the acceptor splice site (NM_153240.4:c.520-1G>T; NG_008130.2:g.8288G>T; Genomic location: 3:132719145 (GRCh38); ClinVar accession number VCV000812666). Allele frequency of this mutation was below the 0.0001 thresholds for recessive gene according to the Genome Aggregation Database (gnomAD), the largest and most comprehensive public source of genetic information of individuals of different ethnic backgrounds to date. The c.520-1G>T variant was further validated using PCR and Sanger sequencing of the amplicons, confirming the diagnosis in all affected family members (II:1 and II:3) and the paternal origin of the mutation (Fig. 1). We speculated that the c.520-1G>T of the *NPHP3* gene is responsible for either the use of cryptic splice sites or exon skipping. We tested this hypothesis by RT-PCR, using total RNAs from leukocytes obtained from

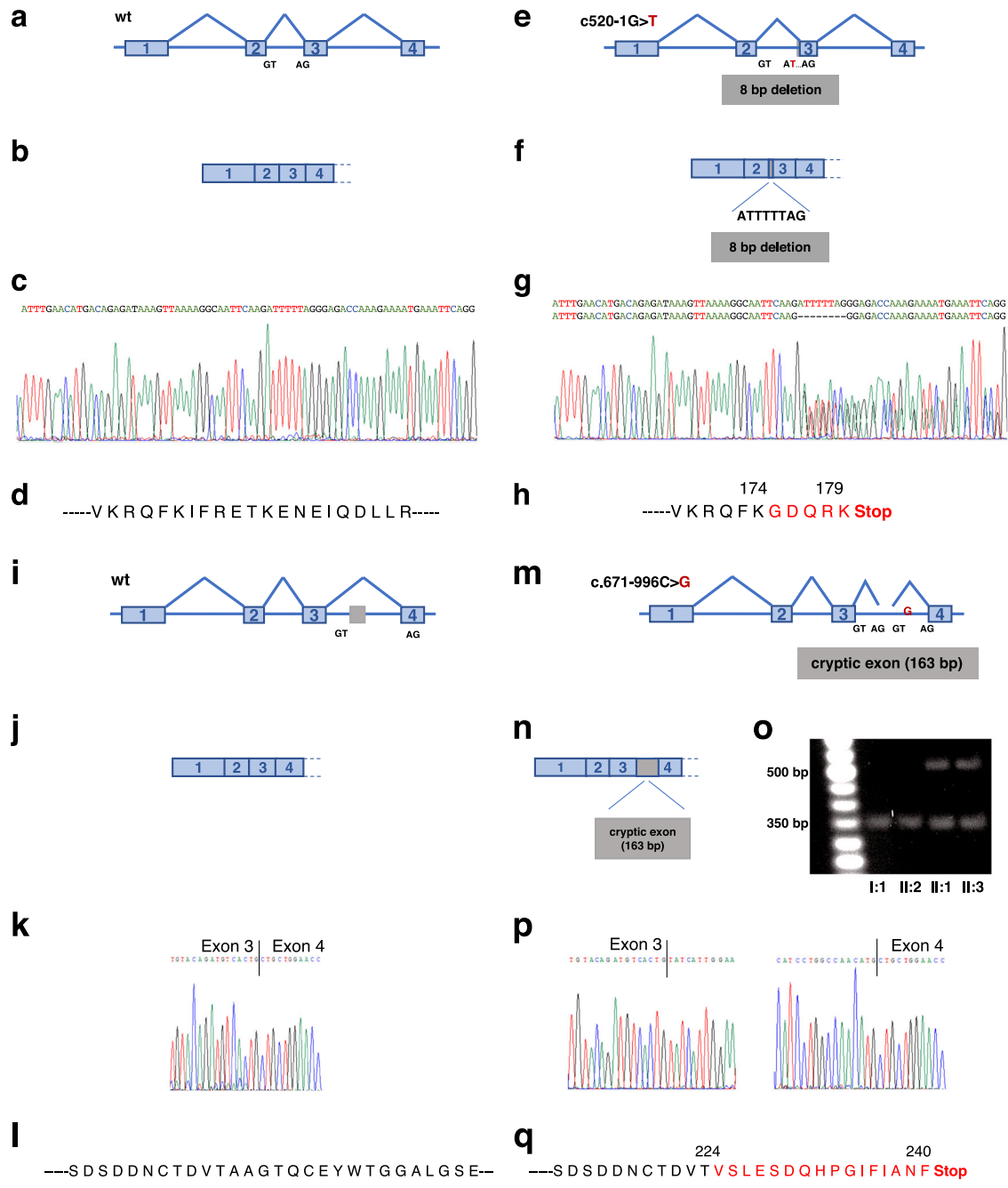


Fig. 2 Effects of the disease-causing genetic variants on *NPHP3* function. Both variants affect *NPHP3* mRNA splicing and impact protein translation through distinct mechanisms. **a–q** Schematic representation of the effect of the splice acceptor site mutation c.520-1G>T and the c.671-996C>G deep intronic variant on *NPHP3* mRNA splicing and its translation into protein. Wild-type sequences are indicated in panels **(a–d)** and **(i–l)**, whereas sequences either bearing the c.520-1G>T mutation or the c.671-996C>G variant are shown in panels **(e–h)** and **(m–q)**, respectively. **a–d**, **i–l** detail the normal splicing of *NPHP3* exon 1 to 4. **e–h** show that the c.520-1G>T mutation activates a cryptic splice site within exon 3 of *NPHP3*, located 8 bp downstream from the authentic 3'-splice acceptor site and leading to a frameshift and premature stop codon, which terminates protein translation 6 codons downstream (p.Ile174Glyfs*6). Representative electropherograms of both normal and mutated cDNA sequences are shown in **(c)** and **(k)**, respectively. **m–q** show that the c.671-996C>G mutation causes aberrant *NPHP3* splicing with the insertion of a 163-nucleotide cryptic exon between exon 3 and 4 generating a frameshift and a premature stop codon at codon 240. **o** Agarose gel electrophoresis image showing aberrant *NPHP3* splicing in affected family members harboring the c.671-996C>G variant. Samples were processed in parallel. Representative electropherograms of both normal and mutated cDNA sequences are shown in **(k)** and **(p)**, respectively.

affected and control family members. Results of this analysis indicated that the c.520-1G>T mutation activates a cryptic splice site within exon 3, located 8 bp downstream from the authentic 3'-splice acceptor site and leading to a frameshift and premature stop codon, which terminates protein translation 6 codons downstream (p.Ile174Glyfs*6) (Fig. 2a–h).

As *NPHP* is inherited in an autosomal recessive manner, we reasoned that our targeted analytical strategy might have missed a deep intronic mutation or a structural variation at the *NPHP3* locus of the maternal allele. Genetic studies have recently suggested that deep intronic disease-causing mutations may be in particular more common than previously thought⁹. Therefore, we performed WGS

for all family members and uncovered the deep intronic mutation NM_153240.4:c.671-996C>G (NG_008130.2:g.9528C>G; Genomic location: 3:132717905 (GRCh38); ClinVar accession number VCV000812665) located in the third intron of *NPHP3*, which was inherited from the mother and segregated with the disease in the expected autosomal recessive mode (Supplementary Table 1). These results were confirmed by Sanger sequencing. No variant at the c.671-996C>G position in *NPHP3* was identified in public databases (1000 Genomes, gnomAD, Bravo), providing further support for the hypothesis that it is likely disease-causing. To gain insight into the functional consequences induced by this deep intronic variant, we performed cDNA sequencing. This analysis revealed that the c.671-996C>G mutation was associated with the insertion of a 163-nucleotide cryptic exon within intron 3 (Genomic location: 3:132717955-132718117 (GRCh38)), located 48 bp downstream of the splice donor site and generating a frameshift as well as a premature stop codon at codon 240 (Fig. 2i–q).

DISCUSSION

Although individually uncommon, rare mendelian diseases collectively affect nearly 300 million people worldwide and thus represent a major public health challenge¹⁰. NGS technologies have revolutionized molecular diagnosis practices, and genetic testing is now on the verge of shifting from a targeted approach to sequencing an entire exome or genome¹¹. In particular, WGS, the most comprehensive sequencing approach, has the great advantage of allowing the detection of all forms of genetic abnormalities in a single-laboratory workflow^{7,11}. In this case report, we highlight the benefit of using WGS as a first-line diagnostic tool, especially in genetically heterogeneous diseases such as NPHP.

NPHP is an inherited disease representing one of the most common monogenic causes of end-stage renal failure in children and young adults. Suspicion of NPHP is mostly based on clinical findings, renal ultrasound imaging, and family history. Although renal ultrasonography represents a very important tool to distinguish NPHP from other inherited kidney disorders including congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) or nephrocalcinosis, molecular genetic analysis is currently the only method available to unequivocally identify NPHP and thus establish with certainty a diagnosis for patients and families. In this case, the proband was found to be compound heterozygous for two deleterious variants in *NPHP3*, a genotype consistent with the associated impaired liver function. Indeed, severe liver abnormalities have been described in patients harboring *NPHP3* loss-of-function mutations^{12,13}. Nevertheless, molecular diagnostic testing of genetically heterogeneous diseases such as NPHP remains challenging even when applying standard NGS methods^{14,15}. For instance, Braun et al., using whole-exome sequencing, failed to identify a causative single-gene mutation in ~30% of affected individuals⁶. Indeed, targeted sequencing of the protein-coding regions and the adjacent splice sites has several technical limitations, in particular for the detection of complex deletion-insertion variants, copy-number variants, or mutations located in intronic regions^{7,14,15}. Our case emphasizes the importance of extending genetic screening of NPHP to sequence variations within deep intronic regions. Indeed, such pathogenic mutations usually result in the activation of non-canonical splice sites or changes in splicing regulatory elements leading to cryptic exon inclusion¹⁶. In our case, our initial targeted sequencing approach only identified one likely deleterious variation affecting the paternal allele, which by disrupting a canonical splice site results in an abnormal NPHP3 transcript containing a premature termination codon. The deleterious mutation inherited from the mother allele was identified in a second step by WGS. This analysis identified indeed a deep intronic variant, c.671-996C>G, that would not have been identified by standard NGS panel nor WES without specific prior knowledge. Interestingly, this intronic sequence

variation most likely also causes aberrant NPHP3 splicing with the inclusion of a cryptic exon either by disrupting a splicing silencer element or creating a splicing enhancer element.

In conclusion, our study demonstrates that using WGS as a first-line test in genetically heterogeneous diseases such as NPHP is a powerful approach to increase diagnostic yields, reduce the time to diagnosis and positively impact the clinical care pathway.

METHODS

This study has been certified to be in accordance with French laws by the Institutional Review Board of Centre Hospitalier Regional Universitaire de Lille. Written informed consent was obtained from all patients.

Whole-genome sequencing

WGS was performed with an average depth of 45× (97.2% of the whole genome was covered by at least 20× coverage). High-quality genomic DNA samples were randomly fragmented by Covaris Technology, and the fragment of 350 bp was obtained after fragment selection. The end repair of DNA fragments was performed, and an “A” base was added at the 3'-end of each strand. Adapters were then ligated to both ends of the end-repaired/dA-tailed DNA fragments, followed by amplification by ligation-mediated PCR (LM-PCR), single-strand separation, and cyclization. The rolling circle amplification (RCA) was performed to produce DNA Nanoballs (DNBs). The qualified DNBs were loaded into the patterned nanoarrays, and pair-end reads were read through on the BGISEQ-500 platform. Sequencing-derived raw image files were processed by BGISEQ-500 base calling Software (v1) with default parameters, and the sequence data of each individual was generated as paired-end reads.

Bioinformatics analysis

Data of each sample were mapped to the human reference genome (GRCh37/HG19) using Burrows–Wheeler Aligner software (v0.7.17). Variant calling was performed using Genome Analysis Toolkit. Variant quality score recalibration method, which uses machine learning to identify annotation profiles of variants that are likely to be real, was applied to get high-confident variant calls. In order to decrease the noise of sequencing data, data filtering was performed and included (1) removing reads containing sequencing adapter; (2) removing reads whose low-quality base ratio (base quality less than or equal to 5) is >50%; (3) removing reads whose unknown base ratio is >10%. Statistical analysis of the data and downstream bioinformatics analysis were performed on this filtered, high-quality data. The SnpEff tool was applied to perform: (1) gene-based annotation: identify whether variants cause protein-coding changes and the amino acids that are affected (2) filter-based annotation: identify variants that are reported in dbSNP v141, or identify the subset of variants with MAF < 1% in the 1000 Genome Project, or identify the subset of coding non-synonymous SNPs with SIFT score < 0.05, or find intergenic variants with GERP++score > 2, or many other annotations on specific mutations.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

WGS data are deposited in SRA (Sequence Read Archive) public repository (Accession number: PRJNA649865). All other relevant data are available from the authors upon request.

Received: 13 April 2020; Accepted: 19 August 2020;

Published online: 21 September 2020

REFERENCES

1. Hildebrandt, F., Benzing, T. & Katsanis, N. Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1533–1543 (2011).
2. Braun, D. A. & Hildebrandt, F. Ciliopathies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a028191 (2017).

3. Luo, F. & Tao, Y. H. Nephronophthisis: a review of genotype–phenotype correlation. *Nephrology* **23**, 904–911 (2018).
4. Choi, Y. J. et al. Mutations of ADAMTS9 cause nephronophthisis-related ciliopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **104**, 45–54 (2019).
5. Stokman, M. F. et al. Clinical and genetic analyses of a Dutch cohort of 40 patients with a nephronophthisis-related ciliopathy. *Pediatr. Nephrol.* **33**, 1701–1712 (2018).
6. Braun, D. A. et al. Whole exome sequencing identifies causative mutations in the majority of consanguineous or familial cases with childhood-onset increased renal echogenicity. *Kidney Int.* **89**, 468–475 (2016).
7. Adams, D. R. & Eng, C. M. Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1353–1362 (2018).
8. Richards, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–424 (2015).
9. Anna, A. & Monika, G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J. Appl. Genet.* **59**, 253–268 (2018).
10. Nguengang Wakap, S. et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur. J. Hum. Genet.* **28**, 165–173 (2020).
11. Sanderson, S. C. et al. Delivering genome sequencing in clinical practice: an interview study with healthcare professionals involved in the 100 000 Genomes Project. *BMJ Open* **9**, e029699 (2019).
12. Olbrich, H. et al. Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat. Genet.* **34**, 455–459 (2003).
13. Tory, K. et al. Mutations of NPHP2 and NPHP3 in infantile nephronophthisis. *Kidney Int.* **75**, 839–847 (2009).
14. Di Resta, C. & Ferrari, M. Next generation sequencing: from research area to clinical practice. *Electron. J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* **29**, 215–220 (2018).
15. Di Resta, C., Galbiati, S., Carrera, P. & Ferrari, M. Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *Electron. J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* **29**, 4–14 (2018).
16. Vaz-Drago, R., Custódio, N. & Carmo-Fonseca, M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum. Genet.* **136**, 1093–1111 (2017).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank patients for their participation in this study. This work was funded by the University Hospital of Lille.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.B. and F.G. designed the study. T.B. performed the experiments. F.B., A.L., V.G., and R.L. analyzed the clinical and sequencing data. N.P., P.C., and C.C. drafted the paper, and all authors participated in the final draft revisions.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41525-020-00147-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.P.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

1 **Whole-genome sequencing revealed a novel structural variant in *COL4A4* causing**
2 **autosomal dominant Alport syndrome: a case report**

3
4
5 4 Clément Delage¹, Marine Andreani², Nihad Boukrout³, Naoual Sabaouni¹, Michaël Perrais³,
6 5 Bruno Lefebvre³, Christelle Cauffiez³, Nicolas Pottier^{1,3,*}, Romain Larrue^{1,3,*}
7
8
9 6

10
11 7 ¹Service de Toxicologie et Génopathies, CHU Lille, F-59000 Lille, France.

12 8 ²Service de Néphrologie, CHU de Nice, F-06000 Nice, France.

13 9 ³Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020-U1277-CANTHER-
14 10 Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France.
15
16
17
18 11

19 12
20 13 * These authors contributed equally to this work

21 14 Keywords: case report, sequencing, Alport diseases, genetic variations

22 15 Corresponding author:

23
24 16 Nicolas Pottier
25 17 Department of Biochemistry
26 18 CHU Lille
27 19 F-59037 LILLE
28 20 nicolas.pottier@univ-lille.fr
29
30
31
32
33
34

35 21 Short running title : A novel structural variant in *COL4A4* causing autosomal dominant Alport
36 22 syndrome
37
38
39
40 23
41 24
42
43 25
44 26
45
46 27
47
48
49 28
50
51 29
52
53 30
54
55 31
56
57 32
58
59 33
60
61
62
63
64
65

34 **Whole-genome sequencing revealed a novel structural variant in *COL4A4* causing**
35 **autosomal dominant Alport syndrome: a case report**

36

37

38 **Abstract**

39 Next-generation sequencing has revolutionized the molecular diagnosis of individuals affected
40 by inherited renal diseases. Indeed, accurate and rapid diagnostic for patients with suspected
41 genetic kidney diseases is not only important for prognosis and patient management but also
42 for genetic counseling. Alport syndrome, an inherited disease characterized by hematuria,
43 progressive renal failure, hearing loss, and ocular abnormalities, is a primary basement
44 membrane disorder arising from mutations in genes encoding the type IV collagen. In this
45 study, we demonstrate the utility of whole-genome sequencing for the molecular diagnosis of
46 a dominant form of Alport syndrome by identifying a novel heterozygous pathogenic structural
47 variant in a family with three affected members. This study provides a framework for applying
48 whole-genome sequencing as a first-line diagnostic tool for inherited kidney diseases and
49 further suggests that structural variations represent an important cause of monogenic
50 disorders.

51

52 1. Introduction

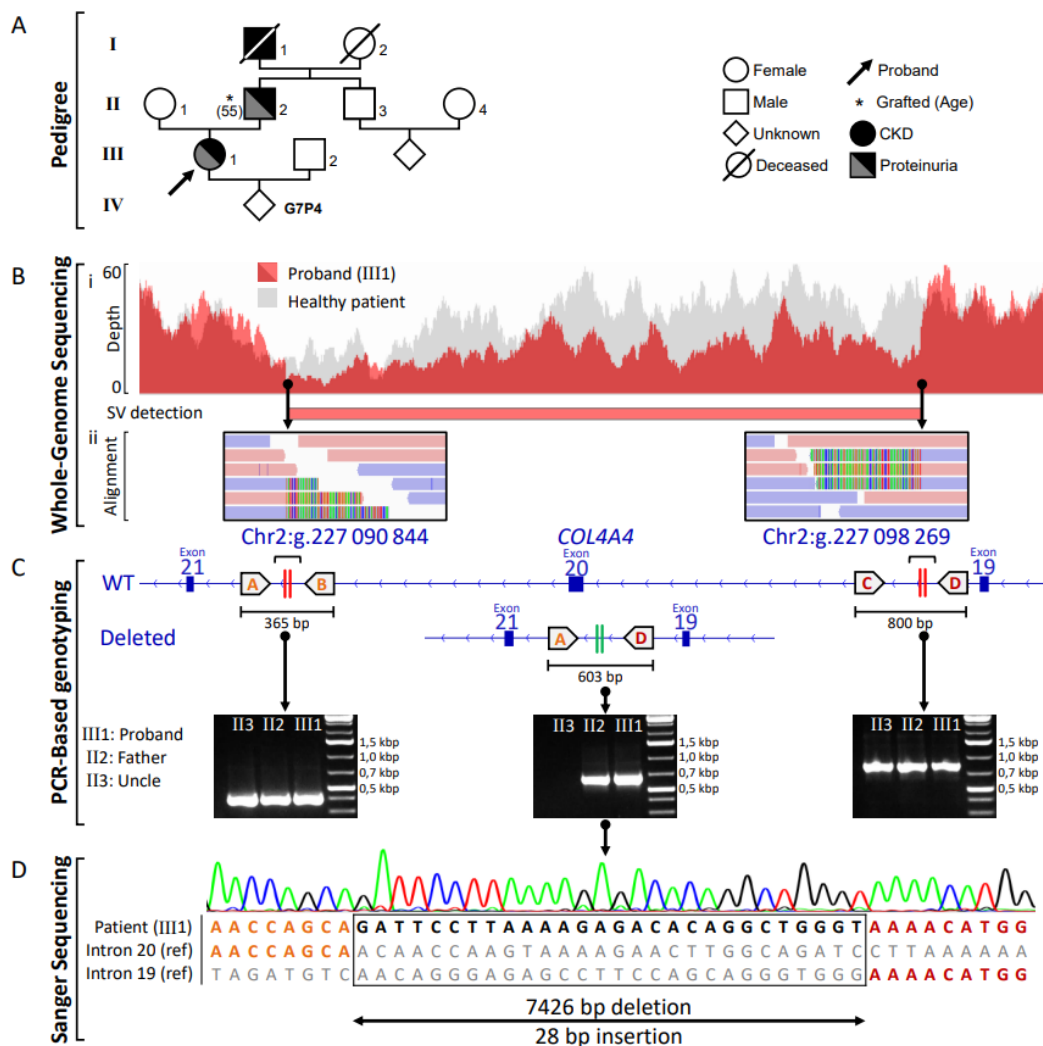
1 Alport syndrome (AS) is a rare form of inherited basalopathy characterized by a structural
2 disorder of the basement membrane (BM) [1,2]. This genetic disease is characterized by the
3
4 54 appearance of nephropathy secondary to progressive glomerulonephritis, high tone
5
6 55 sensorineural deafness and ocular abnormalities including anterior lenticonus or retinal flecks
7
8 56 [3,4]. Type IV collagen is the main collagen constituent of the BM and derived from six
9
10 57 genetically distinct polypeptide chains, named $\alpha 1(\text{IV})$ through $\alpha 6(\text{IV})$, that share between 50%
11
12 58 and 70% homology [5]. Previous biochemical studies have notably shown that three α -chains
13
14 59 assemble into heterotrimeric molecules that further associate to form supramolecular
15
16 60 networks, defining the type IV collagen [5,6]. $\alpha 1(\text{IV})$ and $\alpha 2(\text{IV})$ chains are ubiquitously
17
18 61 expressed in most BMs whereas the remaining α -chains display more restricted tissue
19
20 62 distribution [5,6]. For example, the $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})/\alpha 5(\text{IV})$ network is found mainly in the mature
21
22 63 glomerular BM (GBM) [5].
23
24
25
26 64

27
28
29 65 AS is caused by mutations in type IV collagen genes. Mutations in the X-linked *COL4A5*
30
31 66 gene (MIM#301050) are found in approximately 80% of cases while the remaining 20% present
32
33 67 mutations in the autosomal *COL4A3* or *COL4A4* genes and are transmitted according to a
34
35 68 dominant (MIM#104200) or recessive (MIM#203780) mode of inheritance [7]. Given that all
36
37 69 three type IV collagen α -chains are required to form the heterotrimer, deleterious genetic
38
39 70 variations in any of these type IV collagen genes result in the complete or partial loss of the
40
41 71 $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})/\alpha 5(\text{IV})$ network [5]. As consequences, mutations found in AS patients lead to
42
43 72 severe GBM ultrastructural abnormalities, progressive scarring of glomeruli and impaired
44
45 73 kidney function [5,8]. In this study, we demonstrated, for the first time, the clinical relevance of
46
47 74 applying whole-genome sequencing as a first-line diagnostic tool for AS and further highlighted
48
49 75 that structural variations represent an important cause of AS .
50
51
52

54 2. Case report

55
56
57 77 We report the case of a 42-year-old female (Figure 1A, patient III1) with hematuria,
58
59 78 proteinuria, stage 3b chronic kidney disease (CKD) (creatinine = 164 $\mu\text{mol/L}$, eGFR = 30
60
61
62
63
64
65

79 mL/min/1,73 m²), blood hypertension, dyslipidemia and one renal cyst (2 cm). Patient was
 80 referred to a nephrologist at age of 37 after the discovery of a proteinuria quantified at 2.61
 81 g/24h and a renal biopsy was performed. Analysis of the kidney section by light microscopy
 82 revealed non-specific findings including interstitial fibrosis, tubular atrophy as well as
 83 glomerular lesions such as irregular thickening of Bowman's capsule. However, typical
 84 structural abnormalities associated with AS (splitting and lamellation of the GBM lamina
 85 densa) was found using electron microscopy [9]. Since then, the patient's renal function
 86 showed a progressive decline despite nephroprotective measures such as the use of renin-
 87 angiotensin system inhibitor. A detailed review of family history (Figure 1A) revealed that the
 88 father (II2) and the paternal grandfather (I1) also experienced CKD of unknown origin. The
 89 father (II2) received dialysis at age 50 until he was transplanted at the age of 55 whereas the
 90 grandfather (I4) died at the age of 31 from renal failure.



91

Figure 1. Identification and characterization of a novel structural variant affecting the COL4A4 gene. (A) Pedigree of the family. **(B)** Identification of the structural variant by whole-genome sequencing. (Bi) Read depth plot indicating in the proband the heterozygous ~7.4 kb deletion comprising exon 20 and its surrounding region within the COL4A4 gene in comparison with a healthy individual. (Bii) Integrated Genome Viewer screenshots showing breakpoint sequence alignments. Soft-clipped reads (appearing as multicolor rainbow bands) derive from the deleted allele and delineate the exact breakpoint positions whereas fully mapped reads derive from the wild-type allele (plus strand reads are shown in pink and minus strand reads in blue). **(C)** PCR-based genotyping strategy used to discriminate between the deleted allele and the wild type allele. Four primers (A-D) were designed and three allele-specific PCR including two PCR spanning the deletion breakpoints (indicated by two vertical red stripes) and one PCR surrounding the fusion point between intron 19 and 20 (indicated by two vertical green stripes) were performed using DNA from the proband and his affected father as well as DNA from his healthy uncle. **(D)** Sanger sequencing of the PCR products obtained with the primer A and D was performed to characterize the deleted allele of the proband.

A peripheral blood sample was collected from the proband (III1) and relatives (II2 and II3), and genomic DNA was extracted. Genetic testing for AS was initially carried out using a dedicated targeted Next-generation sequencing (NGS) panel designed to capture the coding regions and the exon–intron boundaries of the COL4A genes associated with AS. Analysis of the sequencing data showed a total of 85 exonic and near splice site variants, but none of them was judged clinically relevant based on frequency and *in silico* analysis. Given the proband clinical features reminiscent of AS, WGS was performed. Indeed, this technology enables the identification of nearly all forms of genetic variations, including disease-causing deep intronic mutations and structural variants, that are largely missed by capture sequencing-based technologies targeting the coding regions [10,11]. This analysis led to the identification of a novel non-recurrent heterozygous 7,4 kb deletion (NC_000002.11(NM_000092.5):c.1204+425_1370-887del) surrounding COL4A4 exon 20. The deletion was detected by comparing read depth to a healthy individual and by examining the sequence of partially misaligned reads (Figure 1B). No additional pathogenic variant was detected. PCRs (Table 1) and Sanger sequencing were then carried out to confirm the NGS result (Figure 1C-D). This variant was also identified by PCR in the proband's father (II2), indicating paternal transmission (Figure 1C). Finally, the uncle (II3) of the proband (III1) showed no abnormalities in the COL4A4 gene, which was consistent with the clinical data (Figure 1C). Overall, the proband was finally diagnosed with autosomal dominant AS, and the 7.4 kb deletion of chromosome 2 was the cause of the disease.

127 **3. Discussion**

1 128 While individually uncommon, rare inherited diseases collectively affect nearly 300
2
3
4 129 million people worldwide and thus represent a major public health issue [12]. NGS technologies
5
6 130 have revolutionized molecular diagnosis practices, and genetic testing is now on the verge of
7
8 131 shifting from a targeted approach to sequencing an entire exome or genome [13]. In particular,
9
10 132 WGS, the most comprehensive sequencing approach, offers the great advantage of allowing
11
12 133 the detection of all forms of genetic alterations in a single-laboratory workflow [13]. In this case
13
14 134 report, we underscore the benefit of using WSG as a first-line diagnostic tool, especially in
15
16 135 inherited kidney diseases such as Alport syndrome.

17
18
19
20 136 AS is a mendelian disease representing the second most common monogenic cause of chronic
21
22 137 kidney diseases after autosomal dominant polycystic kidney disease [14]. Suspicion of AS is
23
24 138 mostly based on clinical and paraclinical findings as well as family history [14]. Although
25
26 139 histological and ultrastructural analyses of the kidney biopsies represent a very important tool
27
28 140 to distinguish AS from other inherited kidney disorders, genetic testing is currently the only
29
30 141 method available to unambiguously identify AS and thus establish with certainty a diagnosis
31
32 142 for patients and families [14]. Nevertheless, molecular analyses of genetically heterogeneous
33
34 143 diseases such as AS is still challenging even when applying standard NGS methods [10].
35
36 144 Indeed, targeted sequencing of the coding regions and adjacent splice sites exhibits several
37
38 145 technical limitations, especially for the detection of complex structural variants which are
39
40 146 common in AS [10,14]. In line with this, the initial targeted sequencing approach did not retrieve
41
42 147 any relevant variant despite strong clinical evidence of AS in the studied proband, whereas a
43
44 148 comprehensive analysis using WGS identified a causative large deletion in *COL4A4*. Genomic
45
46 149 deletions usually occur during double strand break DNA repair through non-replicative repair
47
48 150 mechanisms such as non-homologous end-joining or replicative-based repair mechanisms
49
50 151 including fork stalling and template switching [15-17]. Noteworthy, our analysis revealed the
51
52 152 insertion of a 28 bp sequence at the breakpoint, a phenomenon typically associated with
53
54 153 imprecise repair mechanisms, in particular non-homologous end-joining [15-17].
55
56
57
58
59
60

61 154 **4. Conclusion**

155 In conclusion, our study demonstrates that using WGS as a first-line diagnostic test in
1 156 AS is a powerful approach to increase diagnostic yields, reduces the time to diagnosis and
2
3 157 positively impacts the clinical care pathway.
4
5

6 158 **Ethics Statement**

7
8
9 159 The protocol has been certified to be in accordance with French laws by the Institutional
10
11 160 Review Board of Centre Hospitalier Universitaire de Lille (France). All patients provided their
12
13 161 written informed consent for genetic analysis and to publish this paper in accordance with
14
15 162 institutional guidelines and the Declaration of Helsinki and Istanbul. The DNA collection was
16
17 163 registered by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Paris, France)
18
19
20 164 under the number: DC-2008–642.
21
22

23 165 **Acknowledgements**

24
25 166 None.
26
27

28 167 **References**

- 29
30 168 1. Alport AC. Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br Med J.* 1927 Mar
31 169 19;1(3454):504-6
- 32
33 170 2. Adone A, Anjankar A. Alport Syndrome: A Comprehensive Review. *Cureus.* 2023 Oct
34 171 16;15(10):e47129.
- 35
36 172 3. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome,
37 173 Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med.* 2003 Jun
38 174 19;348(25):2543–56.
- 39
40 175 4. Gregorio VD, Caparali EB, Shojaei A, Ricardo S, Barua M. Alport Syndrome: Clinical
41 176 Spectrum and Therapeutic Advances. *Kidney Med.* 2023 May;5(5):100631.
- 42
43 177 5. Cosgrove D and Liu S. Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement
44 178 membrane in Alport syndrome. *Matrix Biol.* 2017 Jan;57–58:45–54.
- 45
46 179 6. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech.*
47 180 2008 May;71(5):357–70.
- 48
49 181 7. Quinlan C and Rheault MN. Genetic Basis of Type IV Collagen Disorders of the Kidney.
50 182 *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021 Jul;16(7):1101–9.
- 51
52 183 8. Savige J. Alport syndrome: its effects on the glomerular filtration barrier and implications
53 184 for future treatment. *J Physiol.* 2014 Sep 15;592(18):4013–23.
- 54
55 185 9. Bernstein J. The glomerular basement membrane abnormality in Alport's syndrome. *Am*
56 186 *J Kidney Dis.* 1987 Sep;10(3):222–9.
- 57
58 187 10. Larrue R, Chamley P, Bardyn T, Lionet A, Gnemmi V, Cauffiez C, et al. Diagnostic utility
59 188 of whole-genome sequencing for nephronophthisis. *NPJ Genom Med.* 2020;5:38.
60
61
62
63
64
65

- 189 11. Divakar MK, Jain A, Bhojar RC, Senthivel V, Jolly B, Imran M, et al. Whole-genome
190 sequencing of 1029 Indian individuals reveals unique and rare structural variants. J
1 191 Hum Genet. 2023 Jun;68(6):409-417.
- 2
3 192 12. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al.
4 193 Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet
5 194 database. Eur J Hum Genet. 2020 Feb;28(2):165-173.
- 6
7 195 13. Sanderson SC, Hill M, Patch C, Searle B, Lewis C, Chitty LS. Delivering genome
8 196 sequencing in clinical practice: an interview study with healthcare professionals
9 197 involved in the 100 000 Genomes Project. BMJ Open. 2019 Nov 3;9(11):e029699.
- 10
11 198 14. Warady BA, Agarwal R, Bangalore S, Chapman A, Levin A, Stenvinkel P, et al. Alport
12 199 Syndrome Classification and Management. Kidney Med. 2020 Aug 7;2(5):639-649.
- 13
14 200 15. Bursted B, Zamariolli M, Bellucco FT, Melaragno MI. Mechanisms of structural
15 201 chromosomal rearrangement formation. Mol Cytogenet. 2022 Jun 14;15(1):23.
- 16
17 202 16. Weischenfeldt J, Symmons O, Spitz F, Korbel JO. Phenotypic impact of genomic
18 203 structural variation: insights from and for human disease. Nat Rev Genet. 2013
19 204 Feb;14(2):125-38.
- 20
21 205 17. Kurahashi H, Bolor H, Kato T, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, et al. Recent advance
22 206 in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. J Hum
23 207 Genet. 2009 May;54(5):253-60.

24
25 208
26 209
27
28 210
29
30 211

32 **Table 1. List of the primers**

Primer	Localisation	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
A	Intron 20	AGTTTGGCATCCTCCCCAAAT	63.9
B		GCAGGCTGTTCATGTTTCAGG	63.0
C	Intron 19	AGGACTCTTTCCCAGGCTTTTT	61.7
D		TGCACCCCAGAACATTCAATC	63.1

44 213
45
46 214
47
48 215
49

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ADVANCED REVIEW

Pervasive role of the long noncoding RNA DN3OS in development and diseases

Sandy Fellah¹ | Romain Larrue¹ | Marin Truchi² | Georges Vassaux²  | Bernard Mari²  | Christelle Cauffiez¹  | Nicolas Pottier¹ 

¹University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020—UMR-S 1277, Lille, France

²Université Côte d'Azur, CNRS UMR7275, IPMC, Valbonne, France

Correspondence

Christelle Cauffiez, UMR9020-U1277—CANTHER—Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, 1, place de Verdun, 59045 Lille cedex, France.
Email: christelle.cauffiez@univ-lille.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-PRCI FIBROMIR; Association Française contre les Myopathies, Grant/Award Number: 17708; Centre National de la Recherche Scientifique; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; ITMO Cancer Aviesan, Grant/Award Number: 18CN045

Edited by: Jeff Wilusz, Editor-in-Chief

Abstract

Thousands of unique noncoding RNAs (ncRNAs) are expressed in human cells, some are tissue or cell type specific whereas others are considered as house-keeping molecules. Studies over the last decade have modified our perception of ncRNAs from transcriptional noise to functional regulatory transcripts that influence a variety of molecular processes such as chromatin remodeling, transcription, post-transcriptional modifications, or signal transduction. Consequently, aberrant expression of many ncRNAs plays a causative role in the initiation and progression of various diseases. Since the identification of its developmental role, the long ncRNA DN3OS (Dynamin 3 Opposite Strand) has attracted attention of researchers in distinct fields including oncology, fibroproliferative diseases, or bone disorders. Mechanistic studies have in particular revealed the multifaceted nature of DN3OS and its important pathogenic role in several human disorders. In this review, we summarize the current knowledge of DN3OS functions in diseases, with an emphasis on its potential as a novel therapeutic target.

This article is categorized under:

RNA in Disease and Development > RNA in Disease

RNA in Disease and Development > RNA in Development

KEYWORDS

ncRNA, pathogenesis, therapeutics

1 | INTRODUCTION

While the noncoding fraction of the human genome has historically been considered as junk DNA, large scale sequencing studies have instead revealed that the majority of all nucleotides are in fact transcribed into nonprotein-coding RNAs (Djebali et al., 2012). Although a large amount of these transcripts may well be nonfunctional, many breakthrough studies have demonstrated that multiple noncoding RNAs (ncRNAs) are key elements of cellular homeostasis

Sandy Fellah and Romain Larrue contributed equally to this study.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. WIREs RNA published by Wiley Periodicals LLC.

and consequently, their deregulation represents a genuine driving force in the pathogenesis of complex disorders (Lekka & Hall, 2018). This is particularly evident for a class of small ncRNAs called microRNAs (miRNAs) whose aberrant expression is now considered as a common hallmark of diseases (Rupaimoole & Slack, 2017). However, miRNAs are just the tip of the iceberg, and other ncRNAs, especially long noncoding RNAs (lncRNAs), may also play a causative role in the pathogenesis of many distinct human disorders (Chi et al., 2019; Lorenzen & Thum, 2016; Xu et al., 2019).

Noncoding RNAs (ncRNAs) are roughly classified according to their length into small (<50 nt), mid-size (50–200 nt), and long (>200 nt) ncRNAs (Esteller, 2011). lncRNAs are defined as autonomously transcribed RNAs longer than 200 nucleotides with minimal coding potential. They represent a heterogeneous class of functional transcripts comprising intergenic transcripts, enhancer RNAs (eRNAs) as well as transcripts that overlap with other genes in sense or antisense orientation (Lepoivre et al., 2013; Ward et al., 2015; Figure 1a). The number of lncRNA genes in mammals is currently poorly defined and, depending on the studies, ranges between less than 20,000 to over 100,000 in humans (Iyer et al., 2015; Y. Zhao et al., 2016). For example, according to GENCODE v37, 17,957 genes leading to more than 40,000 transcripts have been reported (Frankish et al., 2021). Many lncRNAs have a structure similar to classical mRNAs. Indeed, nearly all of them are transcribed by RNA-polymerase II, spliced, capped, and polyadenylated (Qu et al., 2019). Nevertheless, in contrast to most protein-coding genes, lncRNAs are usually expressed at low levels, tend to contain few introns, exhibit weak sequence constraints, and show limited phylogenetic conservation (J. Li & Liu, 2019).

The function and biological relevance of the vast majority of lncRNAs is still elusive and whether most of these transcripts represent “transcriptional noise” or truly functional biomolecules is currently the subject of intensive debates (Yang & Meng, 2019). Functional lncRNAs have been proposed to exert various distinct biological functions such as transcriptional regulation in *cis* or *trans*, nuclear domain organization, and regulation of proteins or RNA transcripts (Hung & Chang, 2010; Dong et al., 2018). Interestingly, a significant fraction of these ncRNAs has also been shown to associate with ribosomes (Zeng et al., 2018) and several lncRNAs have been demonstrated to encode for functional short peptides (Anderson et al., 2015; Nelson et al., 2016; J. Wang et al., 2019; S. Wang et al., 2019; Figure 1b). Here, we will review the pervasive role of the long ncRNA DN3OS in diseases, with emphasis on its therapeutic potential.

2 | DN3OS

2.1 | Genomic organization and regulation

DN3OS (Dynamamin 3 Opposite Strand) is a 4.1 kb antisense transcript composed of 4 exons located within the 14th intron of the human DN3 gene, a member of the dynamamin GTPases superfamily involved in vesicular trafficking, particularly in endocytosis. As DN3OS contains only short and poorly conserved open reading frames (coding probability of 1.25%, estimated with CPAT (X. Wang et al., 2013)), it belongs to the class of lncRNA by virtue of being more than 200 nucleotides in length (Loebel et al., 2005; Yu et al., 2021; Figure 2). DN3OS exhibits additional typical features of lncRNAs including poor sequence conservation and a limited number of introns. Nevertheless, this lack of conservation is not constant across the entire sequence, as DN3OS contains two highly conserved regions corresponding to miR-199a and miR-214. In fact, it is now well-established that the primary function of DN3OS is to serve as precursors for these small ncRNAs. Indeed, processing of DN3OS theoretically produces four mature miRNAs (miR-199a-5p, miR-199a-3p, miR-214-5p, and miR-214-3p) with very distinct “seed” sequences and consequently a largely nonoverlapping set of target genes (Desvignes et al., 2014; Figure 3). Furthermore, expression of DN3OS greatly varies between cell types and each mature miRNA exhibits distinct expression levels with miR-214-5p being consistently weakly expressed if not absent (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000290).

2.2 | Expression and regulation of DN3OS

Knowledge of the expression pattern and regulation of ncRNAs in tissues is not only essential for understanding their biological role, but also to decipher the pathological consequences associated with their dysregulation. Indeed,

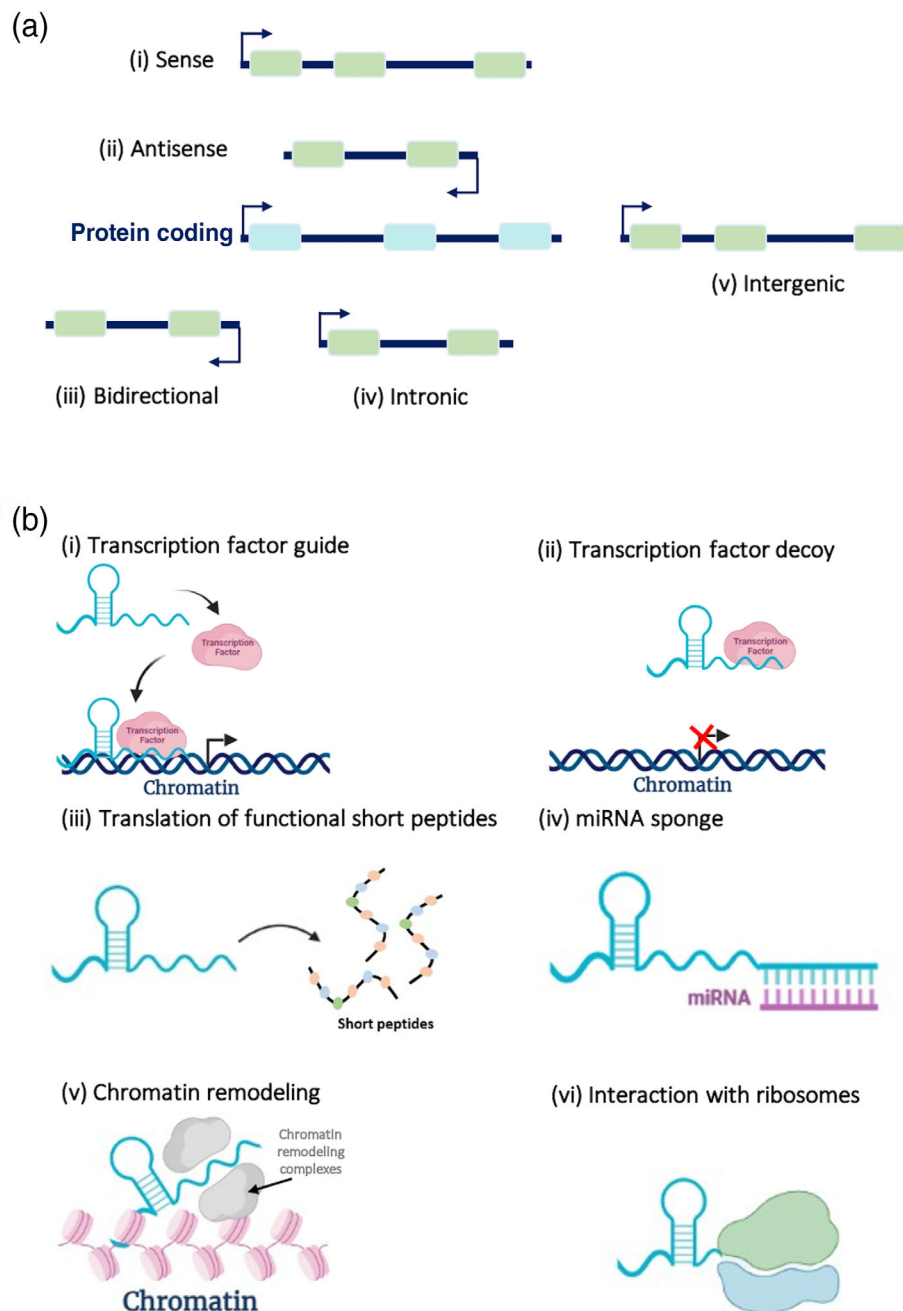


FIGURE 1 Classification and functions of long noncoding RNAs (lncRNAs). (a) lncRNAs originate from various location in the genome and are classified based on their physical proximity with coding genes into five categories: sense, antisense, bidirectional, intronic, and intergenic. (i) Sense lncRNAs are transcribed from the sense strand of a protein-coding gene while (ii) antisense lncRNAs overlap with the antisense strand of a protein coding gene. (iii) Bidirectional lncRNAs are localized within 1 kb of the promoter of a coding gene and oriented in the opposite direction. (iv) Intronic lncRNA derived from an intron of a protein coding gene. (v) Intergenic lncRNAs are located in the genomic region between two coding genes and are subclassified into long intergenic RNAs (lincRNAs) and eRNAs when they are transcribed from an enhancer region of the genome. Protein-coding genes and their exons are represented by blue color, while lncRNAs and their exons are represented by green color. Arrows indicate the direction of transcription. (b) lncRNAs can regulate gene expression through distinct mechanisms including (i) transcription factor guide, (ii) transcription factor decoy, (iii) translation of functional short peptides, (iv) miRNA sponges, (v) scaffold for chromatin modifying complexes, and (vi) interactions with ribosomes.

universally expressed ncRNAs usually constitute the basal transcriptome necessary for the maintenance of basic cellular functions whereas tissue-restricted ncRNAs are typically involved in more specialized biological functions related to the tissues that express them (Barry, 2014; T. F. Guo et al., 2018). Recent single-cell transcriptome profiling studies have

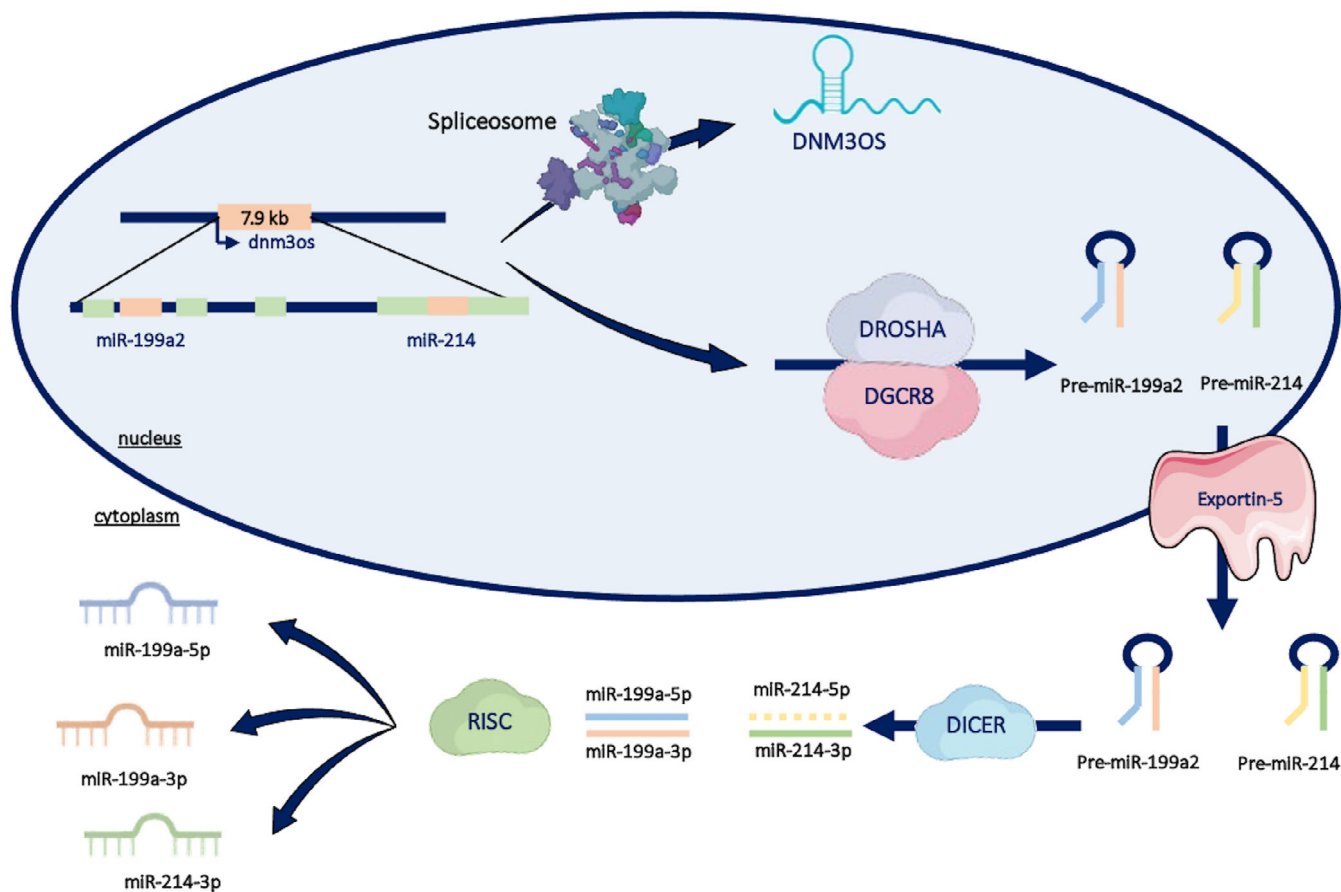


FIGURE 2 Biogenesis of DNMT3OS and its cognate miRNAs. Once transcribed by Pol2, DNMT3OS primary transcript is cleaved by microprocessor to release the pre-miRNAs miR-199a2 and miR-214 or processed by the spliceosome to give rise to the mature form of the nuclear long noncoding RNA DNMT3OS. The pre-miRNA hairpins are exported to the cytoplasm by Exportin 5. In the cytoplasm, the pre-miRNA is cleaved by Dicer to produce miR-199a and miR-214 duplexes. Mature miR-199a-5p, miR-199a-3p, and miR-214-3p are the mature forms whereas miR-214-5p is degraded.

shown that DNMT3OS is significantly expressed in stromal cells such as fibroblasts (Savary et al., 2019; Figure 4). This is consistent with data from the cellular atlas of the developing human kidney which identified interstitial cells as the primary site of DNMT3OS expression (<https://www.gudmap.org/id/16-5WGM@2W2-CDVV-9TFR>). In line with this, miR-214-3p was also identified as a renal stroma-enriched miRNA in a profiling study of a mouse model deficient for the miRNA biogenesis enzyme DICER1 only in Foxd1-derived stromal cells (Phua et al., 2015). In addition, DNMT3OS has been shown to be primarily expressed in fibroblastic cells in both normal and diseased lung (Savary et al., 2019; Figure 4). Nevertheless, the expression pattern of DNMT3OS may be significantly altered in injured versus healthy tissues given the drastic changes in signaling and cellular composition that usually occur during disease initiation and progression (J. Wang et al., 2019; S. Wang et al., 2019).

DNMT3OS is transcribed independently of its host gene DNMT3 and has thus its own transcriptional unit. Indeed, bioinformatic analyses of the nucleotide sequence located upstream of DNMT3OS transcription start site has identified a putative conserved proximal promoter of ~850 bp containing predicted binding sites for several transcription factors including AP2alpha (transcription factor AP-2 alpha), CEBPs (CCAAT/enhancer binding proteins), ETS1 (ETS proto-oncogene 1, transcription factor), SP1 (family of transcription factors), SRF (serum response factor), TCF11 (also known as NFE2L1, nuclear factor, erythroid 2-like 1), and TWIST1 (twist family bHLH transcription factor 1; Roberto et al., 2018). In line with this, TWIST1 has been shown to promote DNMT3OS transcription in several studies by binding to an E-Box promoter element (L. Chen et al., 2015; Lee et al., 2009). Nevertheless, mechanisms involved in DNMT3OS transcriptional control are poorly characterized and, in most cases, limited to the identification of molecular or cellular events associated with changes in the expression levels of DNMT3OS and/or its cognate miRNAs.

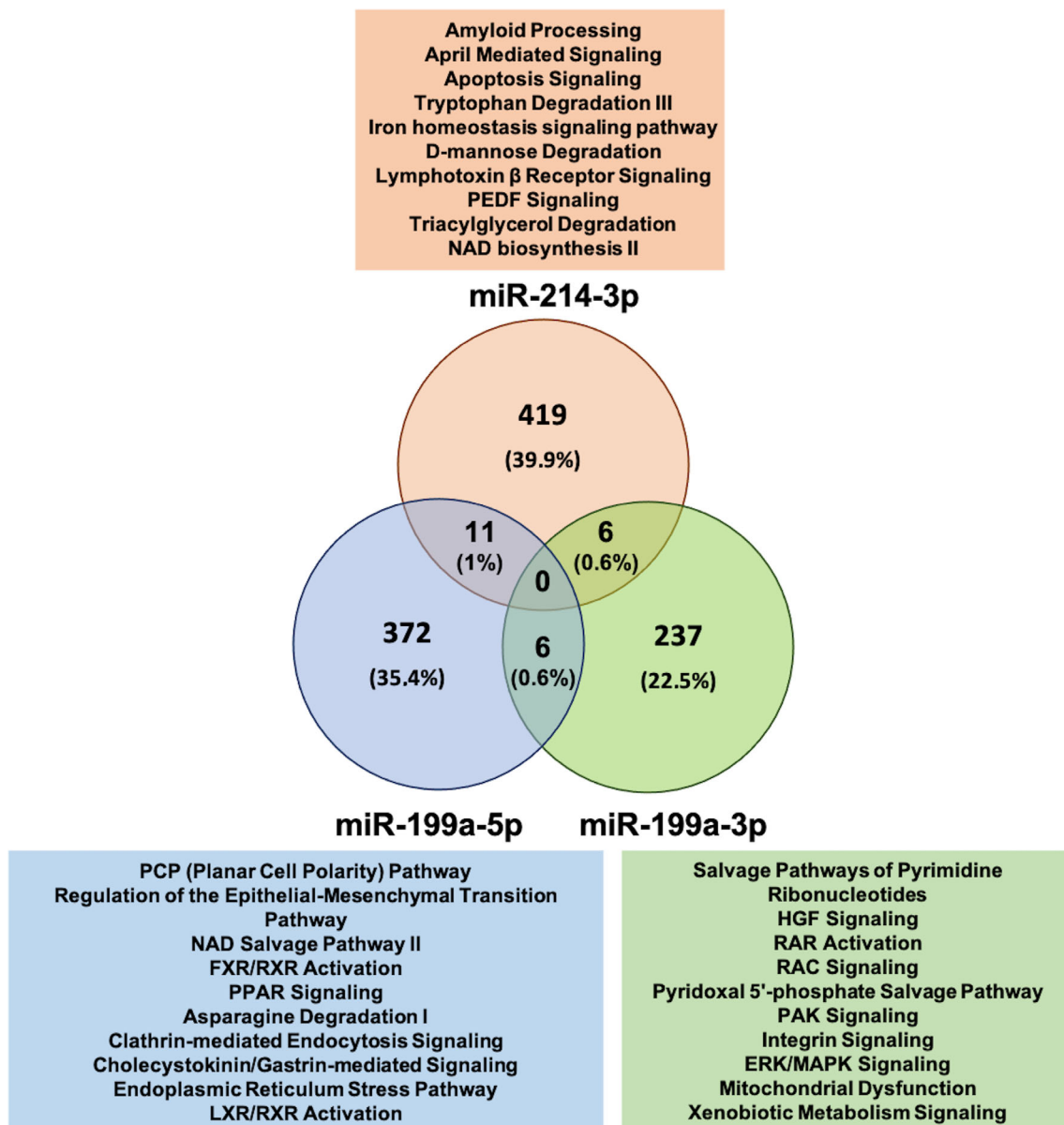


FIGURE 3 The main predicted targets of the DNM3OS-associated miRNAs. Venn diagram showing the low percentage of common targets between the three miRNAs of the cluster, as predicted by TargetsScan 8.0 (based on a Total Target Score < -0.4). Functional annotation of the canonical pathways associated with the different sets of transcripts was performed using IPA (ingenuity pathway analysis).

3 | miRNA DEPENDENT AND INDEPENDENT MECHANISMS

DNM3OS biological functions have been experimentally characterized and involve post-transcriptional regulation of gene expression networks. Hence, diseases associated with aberrant expression of DNM3OS typically exhibit alterations or imbalances of multiple interconnected signaling pathways through miRNA dependent and independent mechanisms. Nevertheless, most studies only evaluated the individual contribution of either DNM3OS or each of its cognate miRNAs. Therefore, we suggest that future studies should assess DNM3OS and miR-199/214 as a whole instead of focusing on only one of these molecular actors. This information is indeed of particular interest notably for effective drug development.

3.1 | miRNA dependent mechanisms

Clustered miRNAs are known to jointly regulate biological pathways either by co-targeting individual genes or by targeting distinct components within the same pathway (Kabekkodu et al., 2018). Studies concerning DNM3OS have

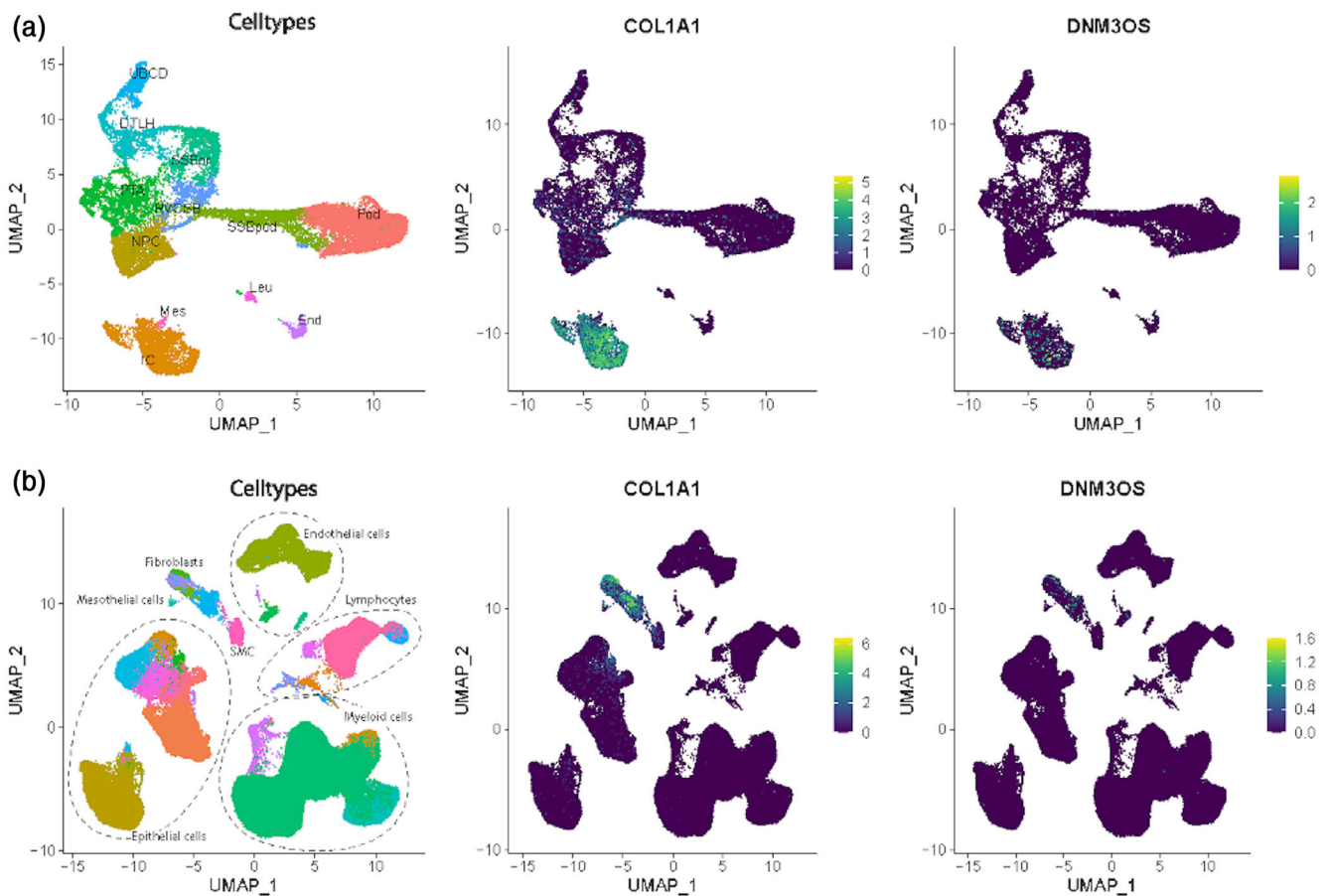


FIGURE 4 DNM3OS is specifically expressed in kidney and lung stromal cells. UMAP visualizations of single cell RNA-seq data showing the specific log-normalized expression of COL1A1 and DNM3OS in (a) interstitial cells from human foetal kidney (Hochane et al., 2019); (b) fibroblasts from human lungs of healthy or interstitial lung disease patients (Habermann et al., 2020). DTLH, distal tubule/loop of Henle; End, endothelial cells; IC, interstitial cells; Leu, leukocyte; Mes, mesangial cell; NPC, nephron progenitor cells; Pod, podocyte; PTA, pretubular aggregate; RVCSB, renal vesicle/comma-shaped body; SSBpr, s-shaped body proximal precursor cells; SSBpod, s-shaped body podocyte precursor cells; UBCD, ureteric bud/collecting duct.

shown that the miR-199/214 cluster usually fine-tunes regulatory networks by targeting distinct but functionally related genes. This is best exemplified by a recent study showing that miR-199a-5p/3p and miR-214-3p are critical intermediates of the TGF- β signaling network in lung fibroblasts by regulating TGF- β receptor turnover as well as interconnected signaling pathways β -catenin or HGF/c-MET molecular pathways (Savary et al., 2019).

DNM3OS-associated miRNAs influence cell signaling through various distinct mechanisms that are not mutually exclusive. These miRNAs can function in certain cases as essential downstream components of several signaling pathway and consequently their aberrant expression directly affects signaling. One example is the cardiac regulation of PPAR δ by miR-214-3p in response to hypoxia. Increased cardiac expression of miR-214-3p is a downstream molecular event of myocardial hypoxia signaling, which is essential for mitochondrial fatty acid metabolism through PPAR δ targeting (el Azzouzi et al., 2013). DNM3OS-associated miRNAs can also regulate the cellular response of signaling pathways by fine tuning a central component of the signaling cascade. In this mode of action, the miRNAs are not directly participating in the signaling pathways but changes in their expression will strongly affect the biological response. For instance, MeCP2-mediated upregulation of miR-199a-5p in neuronal cells has been shown to positively control mTOR signaling by targeting inhibitors of this pathway such as SIRT1. This observation established miR-199a-5p as a central link between MeCP2 and mTOR signaling and has strong implication in the pathogenesis of Rett syndrome, a neurodevelopmental disorder (Tsujimura et al., 2015).

DNM3OS-associated miRNAs can also modulate signaling pathways by regulating feedback mechanisms. In these cases, miRNAs participate in either a negative or a positive feedback loop which serves to limit or amplify a signal, respectively. For example, miR-199a-5p is involved in a positive feedback loop that promotes TGF β signaling in lung

fibroblasts by targeting CAV1, a potent negative regulator of this signaling cascade (Savary et al., 2019). Similarly, miR-214-3p has been shown to promote Akt/mTORC1 signaling by direct targeting of PTEN (Maity et al., 2019), whereas miR-199a-3p dampens p53 signaling by establishing a negative feedback loop through the targeting of CABLES1, a positive regulator of p53 (Figure 5a; Liu et al., 2019).

3.2 | miRNA independent mechanisms

While it was initially presumed that ncRNAs such as DN3OS act primarily through miRNA-based mechanisms, emerging evidences indicate that these transcripts likely have additional molecular functions (D. He et al., 2021). For example, MIR100HG, the precursor of miR-100, and miR-125b, affects proliferation of osteosarcoma cells without an apparent change in the expression levels of its cognate miRNAs (Ghafouri-Fard et al., 2021). Regarding DN3OS, one recent study has shown that this ncRNA is able to induce epigenetic changes by interacting with chromatin through a miRNA-independent mechanism (Das et al., 2018). Nevertheless, additional experiments remain critical to understand the importance of each distinct molecular mechanism and their association with cell types and/or disease states. DN3OS has been also reported to act as miRNA sponge, competing with miR-126 or miR-134-5p and preventing their interaction with target mRNAs (Ai & Yu 2019; H. Wang & Ji et al., 2020). Other minor DN3OS mechanisms have been proposed (Das et al., 2018; J. Wang et al., 2019; S. Wang et al., 2019), as depicted in Figure 5b, but require to be further validated by functional and molecular experiments, as recently underlined (Jacquet et al., 2021).

4 | ROLE OF DN3OS IN DEVELOPMENT

The regulation of gene expression is an essential molecular process for the specification of every cell type in a multicellular organism. Many ncRNAs have emerged as potent developmental regulators in particular by precisely controlling the highly specific spatio-temporal gene expression program of cells during development. Indeed, ncRNAs have several characteristics that make them ideal regulators of development, especially the ability of a single ncRNA to execute whole cellular or organ programs in a coordinated manner by controlling the expression of numerous genes (Sun et al., 2020).

The demonstration of the key role played by DN3OS during normal development was the first evidence supporting this ncRNA as a truly functional transcript instead of just transcriptional noise. In line with this, Watanabe et al. (2008) documented the consequences of DN3OS deletion during development in mice by introducing the lacZ gene into the *Dnm3os* locus to recapitulate its expression pattern and disrupt its function. Importantly, *Dnm3os* targeting was performed very carefully so as not to disrupt the function of its antisense protein-coding transcript, *Dnm3*. This seminal study not only showed that *Dnm3os* is indispensable for normal mouse development, but also that this ncRNA is specifically expressed during mouse embryogenesis in mesoderm-derived tissues such as muscles, dermis, bones or heart. Indeed, loss-of-function of *Dnm3os* in mice impaired embryonic growth and resulted in immediate post-natal death of most animals, mainly due to severe abnormalities including skeletal and muscle defects. Consistent with this, genetic studies have shown that loss of DN3OS likely explains the skeletal abnormalities usually observed in patients with the 1q24 deletion syndrome (Ashraf et al., 2015; Yu et al., 2021). Finally, other important studies have shown that DN3OS is developmentally regulated by the transcription factor Twist-1, and also involved in the regulation of WNT pathway, two developmental molecular processes playing a key role in mesoderm formation. Nevertheless, the exact mechanism by which DN3OS regulates these developmental processes is poorly characterized, and additional *in vivo* studies using for example DN3OS, miR-214, and miR-199a null mice are still needed to delineate the precise contribution of each of these molecular actors during development (Lee et al., 2009).

5 | ROLE OF DN3OS IN CANCER

Tumor development is a multi-step process comprising four overlapping series of events: initiation, promotion/proliferation, infiltration, and metastasis. The progression through these different steps results mainly from the accumulation of multiple genomic and non-genomic events that support tumor development. In particular, expression data from a wide spectrum of neoplastic diseases have evidenced that aberrant ncRNA expression is the rule rather than the

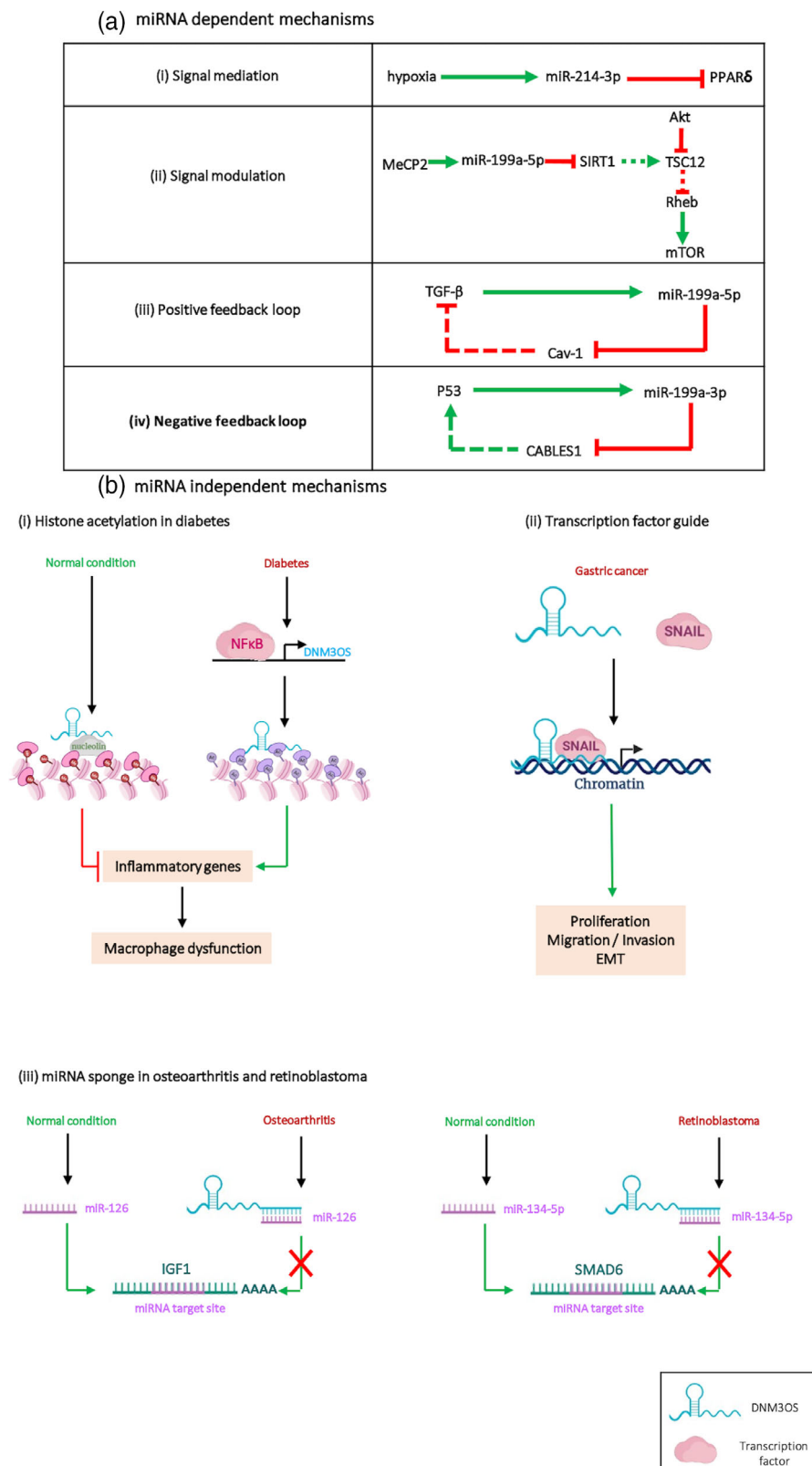


FIGURE 5 Potential DNMT3OS mechanisms of action. DNMT3OS regulates gene expression by two distinct modes of action. (a) miRNA-dependent mechanisms. (i) Signal mediation, in which DNMT3OS cognate miRNAs act as an essential downstream intermediate in the signaling pathway; (ii) signal modulation, in which DNMT3OS cognate miRNAs fine tune a critical component of the signaling pathway; and (iii) amplification or (iv) repression of the signal by participating in positive or negative feedback loops, respectively. (B) miRNA-independent mechanisms. DNMT3OS has been shown to regulate gene expression through (i) epigenetic mechanisms or by functioning as (ii) transcription factor guide or (iii) decoy for miRNAs.

exception during cancer development and many studies have shown their implication in each step associated with tumor development (Slack et al., 2019).

Dysregulation of DN3OS or the miR-199–214 cluster is relatively common in neoplastic diseases (Tables S1–S4), but their influence on tumor development is highly complex and varies depending on the type of cancer. Indeed, DN3OS has been found upregulated in certain malignancies, and thus supposedly oncogenic, but downregulated in other cancers, indicative of tumor suppressor function. For example, DN3OS is highly expressed in ovarian (Mitra et al., 2017) or breast cancers (Alimirah et al., 2016), but underexpressed in hepatocellular carcinoma (Duan et al., 2012) or bladder cancer (W. Li et al., 2021). DN3OS is also thought to play a pathogenic role in certain forms of leukemia or lymphoma, especially Sézary syndrome, the leukemic variant of cutaneous T-cell lymphoma, where DN3OS-associated miRNAs represent the vast majority of aberrantly expressed small ncRNAs (Qin et al., 2012).

Mechanisms for DN3OS deregulation have also been described for several tumors and involved genetic alterations such as amplifications (Mitra et al., 2017) or deletions (Derfoul et al., 2011), epigenetic modifications such as DNA hypermethylation (Cheung et al., 2010) or aberrant transcriptional control (Mitra et al., 2017). Recently, recurrent DN3OS fusion genes associated with the upregulation of this ncRNA have also been discovered in a subset of dedifferentiated liposarcoma (Hirata et al., 2019).

Although the tumorigenic properties of DN3OS cannot be generalized for all tumors, current knowledge suggests its involvement in the main molecular and cellular traits characterizing neoplastic diseases. Indeed, one of the most prominent features of cancer cells is their unlimited growth potential, which is acquired by multiple distinct mechanisms including alteration of signaling cascades controlling cell growth (Feitelson et al., 2015). Expression of miR-199a-3p has for instance been shown to promote breast cancer cell proliferation by targeting CAV2, a major structural component of the “cave-like” invaginations of the cell membrane termed caveolae, which modulate growth factor signaling (Low & Nicholson, 2015). Another important characteristic of cancer cells is their ability to evade growth suppression by preventing the activation or expression of several tumor growth suppressive protein-coding genes (Shatseva et al., 2011). For example, miR-214-3p has been shown to target the well-characterized tumor suppressor PTEN in ovarian malignancies and thus contributes to cancer growth (Liu et al., 2017). In addition to uncontrolled proliferation, evolving tumors are also characterized by their ability to evade cell death pathways, especially apoptosis. Cancer cells have indeed developed a variety of strategies to limit or circumvent apoptosis, the most common being the loss of TP53 tumor suppressor function (Y. He et al., 2019). Interestingly, miR-214-3p is associated with the regulation of the p53 apoptotic pathway in multiple myeloma. In this malignancy, miR-214-3p has been shown to inhibit apoptosis by likely promoting p53 proteasomal degradation through targeting of gankyrin, a component of the 26S proteasome (Misiewicz-Krzeminska et al., 2013). Thus, low expression of miR-214-3p, by impairing p53 signaling, contributes to alter the apoptotic threshold of myeloma cells. Tumorigenesis also results from the accumulation of multiple genetics changes at a rate exceeding that of normal cells. This phenomenon, termed genomic instability, plays in particular a major role in disease evolution by enabling cancer cells to survive under selective pressure and adapt to their microenvironment (Andor et al., 2017). Z. Wang et al. (2014) have shown that miR-214-3p contributes to chromosomal instability in ovarian cancers by targeting RNF8, a RING-finger E3 ubiquitin ligase that promotes DNA repair. Thus, high tumoral expression of miR-214-3p may contribute to the genomic instability of ovarian cancers (Z. Wang et al., 2014).

Other critical aspects of tumor development include invasion of nearby tissues and seeding at distant sites to form metastases as well as sustained angiogenesis to meet the oxygen and nutrient supplies required for tumor growth, which are all influenced by DN3OS-associated miRNAs. For instance, Pencheva et al. (2012) showed that miR-199a-5p and miR-199a-3p promote melanoma metastasis and angiogenesis by synergistically targeting the metabolic gene ApoE and the heat-shock factor DNAJA4. Tumors also develop multiple potent and overlapping mechanisms to escape immune surveillance including recruitment of FOXP3-expressing regulatory T (Treg) cells, a subset of CD4⁺ T cells (Pencheva et al., 2012). Of particular interest, Yin et al. (2014) identified that tumors of various origin actively manipulate immune response by releasing miR-214-3p. Specifically, authors demonstrated that the tumor cell-secreted miR-214-3p can promote Treg expansion by targeting PTEN in CD4⁺ T cells, leading to host immune suppression and rapid tumor growth. Thus, the release of miR-214-3p by neoplastic cells may represent a general mechanism to induce a tumor-promoting microenvironment (Yin et al., 2014).

Tumor-associated inflammation is an additional major feature of tumor progression notably by enhancing angiogenesis, metastatic spread, or genomic instability while causing local immunosuppression (Arvelo et al., 2016). In ovarian cancer, miR-199a-5p has been shown to influence tumor-associated inflammation by regulating NF- κ B activation through IKK β targeting (R. Chen et al., 2008). Indeed, activation of NF- κ B pathway has a major role in cancer development through the initiation and maintenance of a chronic inflammatory microenvironment (Park & Hong, 2016).

Finally, cancer cells are also well-known to exhibit profound metabolic alterations such as enhanced uptake of glucose and conversion of pyruvate to lactate to support their high demands on nutrients for building blocks and energy production (Suzuki et al., 2021). Interestingly, miR-199a-5p has been shown to participate in the metabolic reprogramming of liver cancer cells by directly targeting the hexokinase 2 (HK2), which catalyzes the irreversible first step of glycolysis, thereby promoting glucose consumption and lactate production. Therefore, the low expression of miR-199a-5p usually observed in liver cancers is consistent with the upregulation of HK2 and the high glycolytic activity of these neoplastic cells (W. Guo et al., 2015).

6 | ROLE OF DN3OS IN OTHER DISEASES

Studies over the last decade have shown that DN3OS plays a significant role in various noncancerous diseases by notably influencing the response of tissues to pathogenic stress or injury (Tables S1–S7). Indeed, aberrant expression of DN3OS or associated miRNAs is common in many disorders especially those affecting the heart (el Azzouzi et al., 2013), lungs (C. Li et al., 2014), bones (Watanabe et al., 2008), kidneys (Denby et al., 2014; X. Wang et al., 2016), and muscles (Arrighi et al., 2021; Hashemi Gheinani et al., 2015). For example, DN3OS is thought to play a deleterious role in various bone diseases (Sun et al., 2018), fibrotic diseases (Nosalski et al., 2020), heart failure (el Azzouzi et al., 2013), chronic kidney diseases (Ramalingam et al., 2020), or muscular dystrophies (Alexander et al., 2013). As in cancer, the mechanisms by which DN3OS exerts its deleterious effects are usually tissue/cell type dependent and typically involved miRNA-mediated regulation of pathogenic stress-related pathways. For example, DN3OS is usually upregulated during fibrogenesis, a pathological process associated with organ failure and triggers by various chronic stresses, and typically functions as a profibrotic mediator through distinct tissue-dependent regulatory mechanisms. Indeed, DN3OS has been shown to promote pulmonary fibrosis mainly through a miRNA-mediated amplification of TGF- β signaling (Savary et al., 2019), whereas it induces heart scarring via a distinct miRNA-dependent regulation implicating the PPAR δ pathway (el Azzouzi et al., 2013). Another important example concerns the contribution of DN3OS to the pathophysiological regulation of bone formation during the progression from osteopenia to osteoporosis. Indeed, X. Wang et al. (2013) identified that DN3OS and in particular miR-214-3p participates in the inhibition of osteoblast differentiation and osteoblastic bone formation in skeletal disorders by targeting ATF4, a transcription factor required for osteoblast function (X. Wang et al., 2013). In addition, miR-214-3p has also been shown to play an important role in the differentiation of osteoclasts, a cell type involved in bone loss in pathologic conditions, by targeting the PTEN/PI3K/AKT pathway. Thus, DN3OS is a major regulator of bone formation by not only inhibiting osteoblast differentiation, but also promoting osteoclastogenesis (C. Zhao et al., 2015). Recently, D. Li et al. (2016) further strengthened the link between DN3OS and bone formation by identifying a miR-214-3p-mediated crosstalk between osteoblasts and osteoclasts. This study uncovered in particular that osteoclast-derived exosomal miR-214-3p is transferred to osteoblasts to repress its activity, reducing thereby bone formation (D. Li et al., 2016). Not surprisingly, dysregulation of DN3OS and its cognate miRNAs is associated with various pathological bone conditions such as osteoporosis, osteosarcoma, multiple myeloma, and osteolytic bone metastasis of breast cancer (Sun et al., 2018). DN3OS may also play a causative role in the pathogenesis of chronic kidney diseases regardless of the initiating insults by inducing mitochondrial dysfunction. Indeed, Bai and Jiao (2020) showed that miR-214-3p is involved in the disruption of mitochondrial oxidative phosphorylation occurring during chronic diseases through the direct targeting of mt-Nd6 and mt-Nd4l (Bai & Jiao, 2020). Of particular interest, DN3OS has also been shown to promote macrophage inflammatory response in diabetes mellitus through a miRNA-independent mechanism. Indeed, Das et al. (2018) uncovered that the upregulation of DN3OS in macrophages under diabetic conditions induces enhanced inflammatory gene expression via epigenetic mechanisms independently of its cognate miRNAs. Thus, this DN3OS-dependent novel mechanism might contribute to inflammatory diabetic complications (Das et al., 2018).

DN3OS has also been described to exert protective functions. This is well exemplified by the cardioprotective role uncovered for miR-214-3p during ischemia–reperfusion injury by attenuating Ca²⁺ overload-induced cardiomyocyte death notably through repression of NCX1, a Na⁺/Ca²⁺ exchanger is involved in the regulation of Ca²⁺ concentration in the myocardium (Wan et al., 2015). Another well-described example concerns the protective role of DN3OS in polycystic kidney disease (PKD) progression. Indeed, DN3OS and in particular miR-214-3p are involved in a negative feedback loop that restrains renal cyst growth. Mechanistically, the proinflammatory TLR4/IFN- γ /STAT1 pathway leads to increased expression of miR-214-3p which in turn represses TLR4, by activating DN3OS transcription specifically in cyst-associated stromal cells. The importance of this negative feedback loop in PKD progression was

demonstrated by the phenotype of knockout mice lacking miR-214-3p. Loss of function for this miRNA resulted in a more severe PKD compared to control mice (Lakhia et al., 2020).

7 | PHARMACOLOGICAL TARGETING OF DNM3OS

The highly specific nature of RNA–DNA or RNA–RNA duplex formation has allowed researchers to explore the potential of oligonucleotide-based drugs. Indeed, this novel therapeutic option can virtually target any unique region of the transcriptome and offers the great advantage to pharmacologically manipulate the “undruggable” portion of the genome (Huggins et al., 2019). Currently, double stranded RNA-mediated interference (RNAi) and single stranded anti-sense oligonucleotides (ASOs) are the two main approaches developed for the rational design of nucleic acid-based therapeutics. In particular, next generation nucleic acid-related drugs that are currently in clinical development have demonstrated improved stability as well as high efficacy and reduced off-target effects (Klim et al., 2019).

ASO design typically consists of a central DNA “gap” region flanked by chemically modified nucleotides that increase resistance to nucleases and enhance binding to the complementary target (Asami et al., 2021). These “gapmer” ASOs form a DNA:RNA hybrid with complementary lncRNA that induces RNase H recruitment and promotes degradation of the targeted RNA in the cytoplasm and the nucleus (Jiang et al., 2019; Kulkarni et al., 2021; Winkle et al., 2021). Duplex RNAs, by contrast, function through the natural mechanisms of RNA interference, which primarily occurs in the cytoplasm (Lennox & Behlke, 2016). Therefore, ASOs represent the silencing method of choice when the target lncRNA is thought to function in the nucleus, whereas duplex RNAs are more efficient for cytoplasmic lncRNA (Lennox & Behlke, 2016). As DNM3OS is a nuclear lncRNA that can function through miRNA dependent and independent mechanisms, two distinct strategies can be considered for its pharmacological modulation. One is based on the direct targeting of the long noncoding transcript using notably gapmers (Figure 6a) whereas the second one aims at competitively inhibiting its cognate miRNAs via direct binding to the small RNA species within the RISC complex (Figure 6b). Although, direct targeting of DNM3OS using a single gapmer offers the great advantage to simultaneously inhibit both miRNA dependent and independent functions, this strategy also raises several conceptual and technical issues. First, DNM3OS sequence is weakly conserved across species, making gapmer design and preclinical testing challenging (Savary et al., 2019). Second, given the various important biological roles of DNM3OS as well as its relatively large tissue distribution, *in vivo* silencing of this noncoding transcript may cause significant toxicity. Last, gapmers, given their nuclear uptake, have an increased propensity to induce off-target effects by binding to both intronic and exonic sequences (Savary et al., 2019). Nevertheless, one recent study has shown that the systemic delivery of gapmers designed against *Dnm3os* exerts a potent antifibrotic effect in a preclinical mouse model of pulmonary fibrosis without evidence of toxicity. Importantly, this study provides *in vivo* proof of concept that direct targeting of *Dnm3os* using a single gapmer is sufficient to silence the whole miRNA cluster (Savary et al., 2019).

Alternatively, pharmacological modulation of DNM3OS can also be achieved indirectly by designing ASOs against its cognate miRNAs. This approach, also known as anti-miR therapy, relies essentially on complementary single stranded ASO that sequester the endogenous miRNA in an unrecognized conformation (Pottier et al., 2014). Given that DNM3OS-associated small RNAs are evolutionary conserved, targeting the mature miRNAs is of high interest in particular to simplify the preclinical evaluation of this therapeutic approach. For example, simultaneous administration of anti-miRs designed against miR-214-3p and miR-199a-5p has been shown to ameliorate heart failure induced by pressure overload in mice (el Azzouzi et al., 2013). Nevertheless, administration of more than one anti-miR is questionable from a translational point of view and it may be more realistic to target only one miRNA. In line with this, several preclinical studies have shown the therapeutic benefit of anti-miRs designed against miR-199a-3p, miR-199a-5p, or miR-214-3p in various experimental disease models (Denby et al., 2014; Savary et al., 2019; Yang et al., 2020). Despite much preclinical evidence supporting ncRNAs as promising new candidates for drug design, efficient delivery of RNA-based drugs into targeted tissues remains a challenging task limiting the clinical development of such molecules (Bajan & Hutvagner, 2020). Naked RNA is prone to nuclease degradation, can activate the immune system, and is unable to passively cross the cell membrane (Kaczmarek et al., 2017). Therefore, intensive research efforts have been made to improve delivery of nucleic acid to the tissue of interest. Important developments include nanoparticle encapsulation of RNA, which physically protects nucleic acids from degradation and can facilitate cellular uptake, conjugation of a bioactive ligand such as GalNAc or cell-penetrating peptides to the RNA to improve tissue-specific delivery, as well as RNA modifications including chemical alterations of the ribose sugar, the phosphate linkage and the individual bases, which decrease recognition by the immune system and greatly enhance resistance to degradation (Bennett et al., 2017;

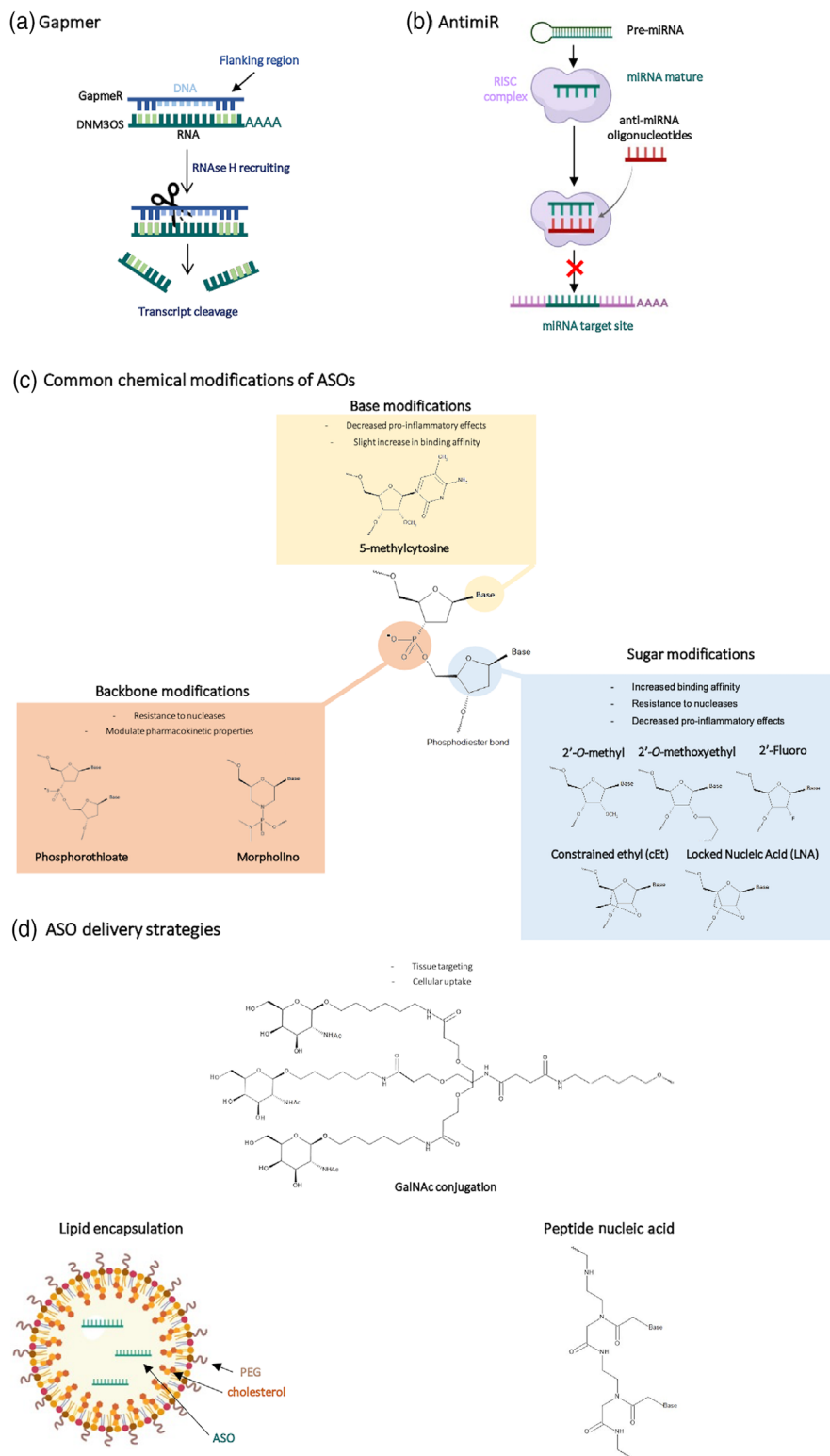


FIGURE 6 Strategies for the pharmacological modulation of DNM3OS. Interfering with DNM3OS function can be achieved through two distinct approaches using oligonucleotide-based drugs. (a) Gapmer single stranded ASOs designed against DNM3OS. This ASO consists of chemically-modified RNA bases flanking both sides of a central 8- to 10-base DNA “gap.” The flanking modified RNA bases increase affinity and improve bioavailability of the oligonucleotide, while the DNA gap binds the targeted RNA and induces its degradation by recruiting RNASEH1. (b) DNM3OS cognate miRNAs can be inhibited by complementary single stranded ASOs that bind and sequester the mature miRNA target in the RISC complex. (c) Common chemical modifications used in oligonucleotide drugs. (d) Examples of oligonucleotide delivery strategies. Various technologies have been developed to improve ASO delivery in particular nanoparticle encapsulation as well as conjugation methods.

Bennett, 2019; Figure 6). To date, most preclinical studies showing a beneficial effect of pharmacological strategies interfering with DN3OS function mainly relies on the systemic administration of chemically-modified oligonucleotides without targeting the tissue of interest. Thus, improving tissue-specific delivery of ASO designed against DN3OS represents one important avenue for future research studies.

8 | CONCLUSION

The current evidence places DN3OS at the nexus of critical pathways that regulate important molecular pathways and cellular functions during normal development as well as in malignancy and various noncancerous diseases. This may have important therapeutic implications, especially as ncRNAs are readily inhibited using ASOs. However, many questions remain to be addressed. Of particular importance is the elucidation of the precise mode of action of DN3OS, notably the contribution of the miRNA-independent mechanisms in various pathophysiological settings. This is indeed critical for the rational design of therapeutic strategies aiming at interfering with DN3OS functions. In any case, the strong association of DN3OS and its cognate miRNAs with many diseases as well as their role in the regulation of key cancer genes make these molecules excellent targets for future research and likely for gene therapy.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Association Française contre les Myopathies, AFM (through grant HuMusmiR #17708), the French Government (Agence Nationale de Recherche, ANR) ANR-PRCI FIBROMIR, and ITMO Cancer Aviesan (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Science and Health) within the framework of the Cancer Plan (Plan Cancer 2018 ARN non-codants en cancérologie: du fondamental au translationnel n° 18CN045).

CONFLICT OF INTEREST

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Sandy Fellah: Writing – original draft (equal). **Romain Larrue:** Writing – original draft (equal). **Marin Truchi:** Formal analysis (equal); writing – original draft (equal). **Georges Vassaux:** Writing – review and editing (equal). **Bernard Mari:** Funding acquisition (lead); writing – review and editing (equal). **Christelle Cauffiez:** Conceptualization (equal); supervision (equal); writing – review and editing (equal). **nicolas pottier:** Writing – review and editing (lead).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing is not applicable to this article as no new data were created or analyzed in this study.

ORCID

Georges Vassaux  <https://orcid.org/0000-0002-1149-7716>

Bernard Mari  <https://orcid.org/0000-0002-0422-9182>

Christelle Cauffiez  <https://orcid.org/0000-0003-0951-7973>

Nicolas Pottier  <https://orcid.org/0000-0001-8913-6286>

RELATED WIREs ARTICLES

[Long non-coding RNAs coordinate cellular responses to stress](#)

REFERENCES

- Ai, D., & Yu, F. (2019). LncRNA DN3OS promotes proliferation and inhibits apoptosis through modulating IGF1 expression by sponging MiR-126 in CHON-001 cells. *Diagnostic Pathology*, 14(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0877-2>
- Alexander, M. S., Kawahara, G., Motohashi, N., Casar, J. C., Eisenberg, I., Myers, J. A., Gasperini, M. J., Estrella, E. A., Kho, A. T., Mitsuhashi, S., Shapiro, F., Kang, P. B., & Kunkel, L. M. (2013). MicroRNA-199a is induced in dystrophic muscle and affects WNT signaling, cell proliferation, and myogenic differentiation. *Cell Death and Differentiation*, 20(9), 1194–1208. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.62>

- Alimirah, F., Peng, X., Gupta, A., Yuan, L., Welsh, J., Cleary, M., & Mehta, R. G. (2016). Crosstalk between the vitamin D receptor (VDR) and miR-214 in regulating SuFu, a hedgehog pathway inhibitor in breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 349(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.08.012>
- Anderson, D. M., Anderson, K. M., Chang, C. L., Makarewich, C. A., Nelson, B. R., McAnally, J. R., Kasaragod, P., Shelton, J. M., Liou, J., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2015). A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*, 160(4), 595–606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009>
- Andor, N., Maley, C. C., & Ji, H. P. (2017). Genomic instability in cancer: Teetering on the limit of tolerance. *Cancer Research*, 77(9), 2179–2185. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1553>
- Arrighi, N., Moratal, C., Savary, G., Fassy, J., Nottet, N., Pons, N., Clément, N., Fellah, S., Larrue, R., Magnone, V., Lebrigand, K., Pottier, N., Dechesne, C., Vassaux, G., Dani, C., Peraldi, P., & Mari, B. (2021). The FibromiR miR-214-3p is upregulated in Duchenne muscular dystrophy and promotes differentiation of human fibro-adipogenic muscle progenitors. *Cell*, 10(7), 1832.
- Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2016). Tumour progression and metastasis. *Ecancermedicalscience*, 10, 617. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.617>
- Asami, Y., Nagata, T., Yoshioka, K., Kunieda, T., Yoshida-Tanaka, K., Bennett, C. F., Seth, P. P., & Yokota, T. (2021). Efficient gene suppression by DNA/DNA double-stranded oligonucleotide in vivo. *Molecular Therapy*, 29(2), 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2020.10.017>
- Ashraf, T., Collinson, M. N., Fairhurst, J., Wang, R., Wilson, L. C., & Foulds, N. (2015). Two further patients with the 1q24 deletion syndrome expand the phenotype: A possible role for the miR199-214 cluster in the skeletal features of the condition. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 167A(12), 3153–3160. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37336>
- Bai, J., & Jiao, W. Y. (2020). Down-regulation of ZEB1 by miR-199a-3p overexpression restrains tumor stem-like properties and mitochondrial function of non-small cell lung cancer. *Oncotargets and Therapy*, 13, 4607–4616. <https://doi.org/10.2147/OTT.S244525>
- Bajan, S., & Hutvagner, G. (2020). RNA-based therapeutics: From antisense oligonucleotides to miRNAs. *Cell*, 9(1), 137. <https://doi.org/10.3390/cells9010137>
- Barry, G. (2014). Integrating the roles of long and small non-coding RNA in brain function and disease. *Molecular Psychiatry*, 19(4), 410–416. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.196>
- Bennett, C. F. (2019). Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age. *Annual Review of Medicine*, 70, 307–321. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217-010829>
- Bennett, C. F., Baker, B. F., Pham, N., Swayze, E., & Geary, R. S. (2017). Pharmacology of antisense drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57, 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104846>
- Chen, L., Chen, R., Kemper, S., Charrier, A., & Brigstock, D. R. (2015). Suppression of fibrogenic signaling in hepatic stellate cells by Twist1-dependent microRNA-214 expression: Role of exosomes in horizontal transfer of Twist1. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(6), G491–G499. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00140.2015>
- Chen, R., Alvero, A. B., Silasi, D. A., Kelly, M. G., Fest, S., Visintin, I., Leiser, A., Schwartz, P. E., Rutherford, T., & Mor, G. (2008). Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 27(34), 4712–4723. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.112>
- Cheung, H. H., Lee, T. L., Davis, A. J., Taft, D. H., Rennert, O. M., & Chan, W. Y. (2010). Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer. *British Journal of Cancer*, 102(2), 419–427. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605505>
- Chi, Y., Wang, D., Wang, J., Yu, W., & Yang, J. (2019). Long non-coding RNA in the pathogenesis of cancers. *Cell*, 8(9), 1015. <https://doi.org/10.3390/cells8091015>
- Das, S., Reddy, M. A., Senapati, P., Stapleton, K., Lanting, L., Wang, M., Amaram, V., Ganguly, R., Zhang, L., Devaraj, S., Schones, D. E., & Natarajan, R. (2018). Diabetes mellitus-induced long noncoding RNA Dnm3os regulates macrophage functions and inflammation via nuclear mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(8), 1806–1820. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310663>
- Denby, L., Ramdas, V., Lu, R., Conway, B. R., Grant, J. S., Dickinson, B., Aurora, A. B., McClure, J. D., Kipgen, D., Delles, C., van Rooij, E., & Baker, A. H. (2014). MicroRNA-214 antagonism protects against renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25(1), 65–80. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013010072>
- Derfoul, A., Juan, A. H., Difilippantonio, M. J., Palanisamy, N., Ried, T., & Sartorelli, V. (2011). Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the polycomb Ezh2 methyltransferase. *Carcinogenesis*, 32(11), 1607–1614. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr184>
- Desvignes, T., Contreras, A., & Postlethwait, J. H. (2014). Evolution of the miR199-214 cluster and vertebrate skeletal development. *RNA Biology*, 11(4), 281–294. <https://doi.org/10.4161/rna.28141>
- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
- Dong, P., Xiong, Y., Yue, J., Hanley, S., Kobayashi, N., Todo, Y., & Watari, H. (2018). Long non-coding RNA NEAT1: A novel target for diagnosis and therapy in human tumors. *Frontiers in Genetics*, 9, 471. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00471>
- Duan, Q., Wang, X., Gong, W., Ni, L., Chen, C., He, X., Chen, F., Yang, L., Wang, P., & Wang, D. W. (2012). ER stress negatively modulates the expression of the miR-199a/214 cluster to regulates tumor survival and progression in human hepatocellular cancer. *PLoS One*, 7(2), e31518.

- el Azzouzi, H., Leptidis, S., Dirx, E., Hoeks, J., van Bree, B., Brand, K., McClellan, E. A., Poels, E., Sluimer, J. C., van den Hoogenhof, M. M., Armand, A. S., Yin, X., Langley, S., Bourajjaj, M., Olieslagers, S., Krishnan, J., Vooijs, M., Kurihara, H., Stubbs, A., ... De Windt, L. J. (2013). The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a~214 targets myocardial PPAR δ and impairs mitochondrial fatty acid oxidation. *Cell Metabolism*, 18(3), 341–354. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.009>
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 12(12), 861–874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Bilsland, A., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35(Suppl), S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Frankish, A., Diekhans, M., Jungreis, I., Lagarde, J., Loveland, J. E., Mudge, J. M., Sisu, C., Wright, J. C., Armstrong, J., Barnes, I., Berry, A., Bignell, A., Boix, C., Carbonell Sala, S., Cunningham, F., Di Domenico, T., Donaldson, S., Fiddes, I. T., García Girón, C., ... Flicek, P. (2021). GENCODE 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D916–D923. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1087>
- Ghafari-Fard, S., Shirvani-Farsani, Z., Hussien, B. M., & Taheri, M. (2021). The critical roles of lncRNAs in the development of osteosarcoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 135, 111217. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111217>
- Guo, T. F., Zhou, M. W., Li, S. H., Ye, B. L., Chen, W., & Fu, Z. B. (2018). Long non-coding RNA for metabolism of bone tissue. *Zhongguo gu shang = China Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 31(3), 286–291. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-0034.2018.03.020>
- Guo, W., Qiu, Z., Wang, Z., Wang, Q., Tan, N., Chen, T., Chen, Z., Huang, S., Gu, J., Li, J., Yao, M., Zhao, Y., & He, X. (2015). MiR-199a-5p is negatively associated with malignancies and regulates glycolysis and lactate production by targeting hexokinase 2 in liver cancer. *Hepatology (Baltimore, MD.)*, 62(4), 1132–1144. <https://doi.org/10.1002/hep.27929>
- Habermann, A. C., Gutierrez, A. J., Bui, L. T., Yahn, S. L., Winters, N. I., Calvi, C. L., Peter, L., Chung, M. I., Taylor, C. J., Jeter, C., Raju, L., Roberson, J., Ding, G., Wood, L., Sucre, J. M. S., Richmond, B. W., Serezani, A. P., McDonnell, W. J., Mallal, S. B., ... Kropski, J. A. (2020). Single-cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages in pulmonary fibrosis. *Science Advances*, 6(28), eaba1972. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1972>
- Hashemi Gheinani, A., Burkhard, F. C., Rehrauer, H., Aquino Fournier, C., & Monastyrskaya, K. (2015). MicroRNA MiR-199a-5p regulates smooth muscle cell proliferation and morphology by targeting WNT2 signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(11), 7067–7086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618694>
- He, D., Wu, D., Muller, S., Wang, L., Saha, P., Ahanger, S. H., Liu, S. J., Cui, M., Hong, S. J., Jain, M., Olson, H. E., Akesson, M., Costello, J. F., Diaz, A., & Lim, D. A. (2021). miRNA-independent function of long noncoding pri-miRNA loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(13), e2017562118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017562118>
- He, Y., Johnson, D. T., Yang, J. S., Wu, H., You, S., Yoon, J., Lee, D. H., Kim, W. K., Aldahl, J., Le, V., Hooker, E., Yu, E. J., Geradts, J., Cardiff, R. D., & Sun, Z. (2019). Loss of the tumor suppressor, Tp53, enhances the androgen receptor-mediated oncogenic transformation and tumor development in the mouse prostate. *Oncogene*, 38(38), 6507–6520. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0901-8>
- Hirata, M., Asano, N., Katayama, K., Yoshida, A., Tsuda, Y., Sekimizu, M., Mitani, S., Kobayashi, E., Komiyama, M., Fujimoto, H., Goto, T., Iwamoto, Y., Naka, N., Iwata, S., Nishida, Y., Hiruma, T., Hiraga, H., Kawano, H., Motoi, T., ... Matsuda, K. (2019). Integrated exome and RNA sequencing of dedifferentiated liposarcoma. *Nature Communications*, 10(1), 5683. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13286-z>
- Hochane, M., van den Berg, P. R., Fan, X., Bérenger-Currias, N., Adegeest, E., Bialecka, M., Nieveen, M., Menschaart, M., de Sousa, C., Lopes, S. M., & Semrau, S. (2019). Single-cell transcriptomics reveals gene expression dynamics of human fetal kidney development. *PLoS Biology*, 17(2), e3000152. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000152>
- Huggins, I. J., Medina, C. A., Springer, A. D., van den Berg, A., Jadhav, S., Cui, X., & Dowdy, S. F. (2019). Site selective antibody-oligonucleotide conjugation via microbial transglutaminase. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(18), 3287. <https://doi.org/10.3390/molecules24183287>
- Hung, T., & Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA in genome regulation: Prospects and mechanisms. *RNA Biology*, 7(5), 582–585. <https://doi.org/10.4161/rna.7.5.13216>
- Iyer, M. K., Niknafs, Y. S., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., Barrette, T. R., Prensner, J. R., Evans, J. R., Zhao, S., Poliakov, A., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., Wu, Y. M., Robinson, D. R., Beer, D. G., Feng, F. Y., Iyer, H. K., & Chinnaiyan, A. M. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genetics*, 47(3), 199–208. <https://doi.org/10.1038/ng.3192>
- Jacquet, K., Vidal-Cruchez, O., Rezzonico, R., Nicolini, V. J., Mograbi, B., Hofman, P., Vassaux, G., Mari, B., & Brest, P. (2021). New technologies for improved relevance in miRNA research. *Trends in Genetics: TIG*, 37(12), 1060–1063.
- Jiang, M. C., Ni, J. J., Cui, W. Y., Wang, B. Y., & Zhuo, W. (2019). Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *American Journal of Cancer Research*, 9(7), 1354–1366.
- Kabekkodu, S. P., Shukla, V., Varghese, V. K., D'Souza, J., Chakrabarty, S., & Satyamoorthy, K. (2018). Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(4), 1955–1986. <https://doi.org/10.1111/brv.12428>
- Kaczmarek, J. C., Kowalski, P. S., & Anderson, D. G. (2017). Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality. *Genome Medicine*, 9(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0450-0>
- Klim, J. R., Vance, C., & Scotter, E. L. (2019). Antisense oligonucleotide therapies for amyotrophic lateral sclerosis: Existing and emerging targets. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 110, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.03.009>

- Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Thomson, S. B., Chen, S., Leavitt, B. R., Cullis, P. R., & van der Meel, R. (2021). The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nature Nanotechnology*, *16*(6), 630–643. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00898-0>
- Lakhia, R., Yheskel, M., Flaten, A., Ramalingam, H., Aboudehen, K., Ferrè, S., Biggers, L., Mishra, A., Chaney, C., Wallace, D. P., Carroll, T., Igarashi, P., & Patel, V. (2020). Interstitial microRNA miR-214 attenuates inflammation and polycystic kidney disease progression. *JCI Insight*, *5*(7), e133785.
- Lee, Y. B., Bantounas, I., Lee, D. Y., Phylactou, L., Caldwell, M. A., & Uney, J. B. (2009). Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Research*, *37*(1), 123–128. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn920>
- Lekka, E., & Hall, J. (2018). Noncoding RNAs in disease. *FEBS Letters*, *592*(17), 2884–2900. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13182>
- Lennox, K. A., & Behlke, M. A. (2016). Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, *44*(2), 863–877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1206>
- Lepoivre, C., Belhocine, M., Bergon, A., Griffon, A., Yammine, M., Vanhille, L., Zacarias-Cabeza, J., Garibal, M. A., Koch, F., Maqbool, M. A., Fenouil, R., Lloriod, B., Holota, H., Gut, M., Gut, I., Imbert, J., Andrau, J. C., Puthier, D., & Spicuglia, S. (2013). Divergent transcription is associated with promoters of transcriptional regulators. *BMC Genomics*, *14*, 914. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-914>
- Li, C., Mpollo, M. S., Gonsalves, C. S., Tahara, S. M., Malik, P., & Kalra, V. K. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor- α -mediated transcription of miR-199a2 attenuates endothelin-1 expression via hypoxia-inducible factor-1 α . *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(52), 36031–36047. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.600775>
- Li, D., Liu, J., Guo, B., Liang, C., Dang, L., Lu, C., He, X., Cheung, H. Y., Xu, L., Lu, C., He, B., Liu, B., Shaikh, A. B., Li, F., Wang, L., Yang, Z., Au, D. W., Peng, S., Zhang, Z., ... Zhang, G. (2016). Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nature Communications*, *7*, 10872. <https://doi.org/10.1038/ncomms10872>
- Li, J., & Liu, C. (2019). Coding or noncoding, the converging concepts of RNAs. *Frontiers in Genetics*, *10*, 496. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00496>
- Li, W., Yan, P., Meng, X., Zhang, J., & Yang, Y. (2021). The microRNA cluster miR-214/miR-3120 prevents tumor cell switching from an epithelial to a mesenchymal-like phenotype and inhibits autophagy in gallbladder cancer. *Cellular Signalling*, *80*, 109887. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109887>
- Liu, J., Chen, W., Zhang, H., Liu, T., & Zhao, L. (2017). miR-214 targets the PTEN-mediated PI3K/Akt signaling pathway and regulates cell proliferation and apoptosis in ovarian cancer. *Oncology Letters*, *14*(5), 5711–5718. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6953>
- Liu, J., Wang, Y., Cui, J., Sun, M., Pu, Z., Wang, C., Du, W., Liu, X., Wu, J., Hou, J., Zhang, S., & Yu, B. (2019). Correction to: miR199a-3p regulates P53 by targeting CABLES1 in mouse cardiac c-kit+ cells to promote proliferation and inhibit apoptosis through a negative feedback loop. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 404. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1514-4>
- Loebel, D. A., Tsoi, B., Wong, N., & Tam, P. P. (2005). A conserved noncoding intronic transcript at the mouse Dnm3 locus. *Genomics*, *85*(6), 782–789. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.02.001>
- Lorenzen, J. M., & Thum, T. (2016). Long noncoding RNAs in kidney and cardiovascular diseases. *Nature Reviews. Nephrology*, *12*(6), 360–373. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.51>
- Low, J. Y., & Nicholson, H. D. (2015). Epigenetic modifications of caveolae associated proteins in health and disease. *BMC Genetics*, *16*, 71. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0231-y>
- Maity, S., Das, F., Ghosh-Choudhury, N., Kasinath, B. S., & Ghosh Choudhury, G. (2019). High glucose increases miR-214 to power a feedback loop involving PTEN and the Akt/mTORC1 signaling axis. *FEBS Letters*, *593*(16), 2261–2272. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13505>
- Misiewicz-Krzeminska, I., Sarasquete, M. E., Quwaider, D., Krzeminski, P., Ticona, F. V., Paíno, T., Delgado, M., Aires, A., Ocio, E. M., García-Sanz, R., San Miguel, J. F., & Gutiérrez, N. C. (2013). Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of P53 and inhibition of DNA replication. *Haematologica*, *98*(4), 640–648. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.070011>
- Mitra, R., Chen, X., Greenawalt, E. J., Maulik, U., Jiang, W., Zhao, Z., & Eischen, C. M. (2017). Decoding critical long non-coding RNA in ovarian cancer epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Communications*, *8*(1), 1604. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01781-0>
- Nelson, B. R., Makarewich, C. A., Anderson, D. M., Winders, B. R., Troupes, C. D., Wu, F., Reese, A. L., McAnally, J. R., Chen, X., Kavalali, E. T., Cannon, S. C., Houser, S. R., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2016). A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6270), 271–275. <https://doi.org/10.1126/science.aad4076>
- Nosalski, R., Siedlinski, M., Denby, L., McGinnigle, E., Nowak, M., Cat, A., Medina-Ruiz, L., Cantini, M., Skiba, D., Wilk, G., Osmenda, G., Rodor, J., Salmeron-Sanchez, M., Graham, G., Maffia, P., Graham, D., Baker, A. H., & Guzik, T. J. (2020). T-cell-derived miRNA-214 mediates perivascular fibrosis in hypertension. *Circulation Research*, *126*(8), 988–1003. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.3154>
- Park, M. H., & Hong, J. T. (2016). Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cell*, *5*(2), 15. <https://doi.org/10.3390/cells5020015>
- Pencheva, N., Tran, H., Buss, C., Huh, D., Drobnyak, M., Busam, K., & Tavazoie, S. F. (2012). Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. *Cell*, *151*(5), 1068–1082. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.028>
- Phua, Y. L., Chu, J. Y., Marrone, A. K., Bodnar, A. J., Sims-Lucas, S., & Ho, J. (2015). Renal stromal miRNAs are required for normal nephrogenesis and glomerular mesangial survival. *Physiological Reports*, *3*(10), e12537. <https://doi.org/10.14814/phy2.12537>

- Pottier, N., Cauffiez, C., Perrais, M., Barbry, P., & Mari, B. (2014). FibromiRs: Translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(3), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.01.003>
- Qin, Y., Buermans, H. P., van Kester, M. S., van der Fits, L., Out-Luiting, J. J., Osanto, S., Willemze, R., Vermeer, M. H., & Tensen, C. P. (2012). Deep-sequencing analysis reveals that the miR-199a2/214 cluster within DN30s represents the vast majority of aberrantly expressed microRNAs in Sézary syndrome. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(5), 1520–1522. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.481>
- Qu, D., Yang, Y., & Huang, X. (2019). miR-199a-5p promotes proliferation and metastasis and epithelial-mesenchymal transition through targeting PIAS3 in cervical carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8), 13562–13572. <https://doi.org/10.1002/jcb.28631>
- Ramalingam, H., Yheskel, M., & Patel, V. (2020). Modulation of polycystic kidney disease by non-coding RNAs. *Cellular Signalling*, 71, 109548. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109548>
- Roberto, V. P., Gavaia, P., Nunes, M. J., Rodrigues, E., Cancela, M. L., & Tiago, D. M. (2018). Evidences for a new role of miR-214 in Chondrogenesis. *Scientific Reports*, 8(1), 3704. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21735-w>
- 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>
- Savary, G., Dewaeles, E., Diazz, S., Buscot, M., Nottet, N., Fassy, J., Courcot, E., Henaoui, I. S., Lemaire, J., Martis, N., Van der Hauwaert, C., Pons, N., Magnone, V., Leroy, S., Hofman, V., Plantier, L., Lebrigand, K., Paquet, A., Lino Cardenas, C. L., ... Pottier, N. (2019). The long noncoding RNA DN30S is a reservoir of FibromiRs with major functions in lung fibroblast response to TGF- β and pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(2), 184–198. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1237OC>
- Shatseva, T., Lee, D. Y., Deng, Z., & Yang, B. B. (2011). MicroRNA miR-199a-3p regulates cell proliferation and survival by targeting caveolin-2. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 16), 2826–2836. <https://doi.org/10.1242/jcs.077529>
- Slack, F. J., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The role of non-coding RNAs in oncology. *Cell*, 179(5), 1033–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017>
- Sun, Y., Kuek, V., Liu, Y., Tickner, J., Yuan, Y., Chen, L., Zeng, Z., Shao, M., He, W., & Xu, J. (2018). MiR-214 is an important regulator of the musculoskeletal metabolism and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 234(1), 231–245. <https://doi.org/10.1002/jcp.26856>
- Sun, Y., Yu, Q., Li, L., Mei, Z., Zhou, B., Liu, S., Pan, T., Wu, L., Lei, Y., Liu, L., Drmanac, R., Ma, K., & Liu, S. (2020). Single-cell RNA profiling links ncRNAs to spatiotemporal gene expression during *C. elegans* embryogenesis. *Scientific Reports*, 10(1), 18863. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75801-3>
- Suzuki, H., Kohjima, M., Tanaka, M., Goya, T., Itoh, S., Yoshizumi, T., Mori, M., Tsuda, M., Takahashi, M., Kurokawa, M., Imoto, K., Tashiro, S., Kuwano, A., Kato, M., Okada, S., Nakamura, M., & Ogawa, Y. (2021). Metabolic alteration in hepatocellular carcinoma: Mechanism of lipid accumulation in well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 8813410–8813413. <https://doi.org/10.1155/2021/8813410>
- Tsujimura, K., Irie, K., Nakashima, H., Egashira, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Itoh, M., Uesaka, M., Imamura, T., Nakahata, Y., Yamashita, Y., Abe, T., Takamori, S., & Nakashima, K. (2015). miR-199a links MeCP2 with mTOR signaling and its dysregulation leads to Rett syndrome phenotypes. *Cell Reports*, 12(11), 1887–1901. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.028>
- Wan, D. Y., Zhang, Z., & Yang, H. H. (2015). Cardioprotective effect of miR-214 in myocardial ischemic postconditioning by down-regulation of hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 61(2), 1–6.
- Wang, H., & Ji, X. (2020). SMAD6, positively regulated by the DN30S-miR-134-5p axis, confers promoting effects to cell proliferation, migration and EMT process in retinoblastoma. *Cancer Cell International*, 20, 23. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1103-8>
- Wang, J., Zhu, S., Meng, N., He, Y., Lu, R., & Yan, G. R. (2019). ncRNA-encoded peptides or proteins and cancer. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 27(10), 1718–1725. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.001>
- Wang, S., Ni, B., Zhang, Z., Wang, C., Wo, L., Zhou, C., Zhao, Q., & Zhao, E. (2019). Long non-coding RNA DN30S promotes tumor progression and EMT in gastric cancer by associating with snail. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 511(1), 57–62.
- Wang, X., Guo, B., Li, Q., Peng, J., Yang, Z., Wang, A., Li, D., Hou, Z., Lv, K., Kan, G., Cao, H., Wu, H., Song, J., Pan, X., Sun, Q., Ling, S., Li, Y., Zhu, M., Zhang, P., ... Li, Y. (2013). miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nature Medicine*, 19(1), 93–100. <https://doi.org/10.1038/nm.3026>
- Wang, X., Shen, E., Wang, Y., Li, J., Cheng, D., Chen, Y., Gui, D., & Wang, N. (2016). Cross talk between miR-214 and PTEN attenuates glomerular hypertrophy under diabetic conditions. *Scientific Reports*, 6, 31506. <https://doi.org/10.1038/srep31506>
- Wang, Z., Yin, H., Zhang, Y., Feng, Y., Yan, Z., Jiang, X., Bukhari, I., Iqbal, F., Cooke, H. J., & Shi, Q. (2014). miR-214-mediated down-regulation of RNF8 induces chromosomal instability in ovarian cancer cells. *Cell Cycle*, 13(22), 3519–3528.
- Ward, M., McEwan, C., Mills, J. D., & Janitz, M. (2015). Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs. *Journal of Human Transcriptome*, 1(1), 2–9. <https://doi.org/10.3109/23324015.2015.1077591>
- Watanabe, T., Sato, T., Amano, T., Kawamura, Y., Kawamura, N., Kawaguchi, H., Yamashita, N., Kurihara, H., & Nakaoka, T. (2008). Dnm30s, a non-coding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice. *Developmental Dynamics*, 237(12), 3738–3748. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21787>
- Winkle, M., El-Daly, S. M., Fabbri, M., & Calin, G. A. (2021). Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(8), 629–651. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00219-z>
- Xu, F., Jin, L., Jin, Y., Nie, Z., & Zheng, H. (2019). Long noncoding RNAs in autoimmune diseases. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 107(2), 468–475. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36562>

- Yang, L., Zhang, L., Lu, L., & Wang, Y. (2020). miR-214-3p regulates multi-drug resistance and apoptosis in retinoblastoma cells by targeting ABCB1 and XIAP. *Oncotargets and Therapy*, *13*, 803–811. <https://doi.org/10.2147/OTT.S235862>
- Yang, X., & Meng, T. (2019). Long noncoding RNA in preeclampsia: Transcriptional noise or innovative indicators? *BioMed Research International*, *2019*, 5437621–5437627. <https://doi.org/10.1155/2019/5437621>
- Yin, Y., Cai, X., Chen, X., Liang, H., Zhang, Y., Li, J., Wang, Z., Chen, X., Zhang, W., Yokoyama, S., Wang, C., Li, L., Li, L., Hou, D., Dong, L., Xu, T., Hiroi, T., Yang, F., Ji, H., ... Zhang, C. Y. (2014). Tumor-secreted miR-214 induces regulatory T cells: A major link between immune evasion and tumor growth. *Cell Research*, *24*(10), 1164–1180. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.121>
- Yu, T. T., Xu, Q. F., Li, S. Y., Huang, H. J., Dugan, S., Shao, L., Roggenbuck, J. A., Liu, X. T., Liu, H. Z., Hirsch, B. A., Yue, S., Liu, C., & Cheng, S. Y. (2021). Deletion at an 1q24 locus reveals a critical role of long noncoding RNA DNMT3OS in skeletal development. *Cell & Bioscience*, *11*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00559-8>
- Zeng, C., Fukunaga, T., & Hamada, M. (2018). Identification and analysis of ribosome-associated lncRNAs using ribosome profiling data. *BMC Genomics*, *19*(1), 414. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4765-z>
- Zhao, C., Sun, W., Zhang, P., Ling, S., Li, Y., Zhao, D., Peng, J., Wang, A., Li, Q., Song, J., Wang, C., Xu, X., Xu, Z., Zhong, G., Han, B., Chang, Y. Z., & Li, Y. (2015). miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. *RNA Biology*, *12*(3), 343–353. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1017205>
- Zhao, Y., Li, H., Fang, S., Kang, Y., Wu, W., Hao, Y., Li, Z., Bu, D., Sun, N., Zhang, M. Q., & Chen, R. (2016). NONCODE 2016: An informative and valuable data source of long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D203–D208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1252>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Fellah, S., Larrue, R., Truchi, M., Vassaux, G., Mari, B., Cauffiez, C., & Pottier, N. (2023). Pervasive role of the long noncoding RNA DNMT3OS in development and diseases. *WIREs RNA*, *14*(2), e1736. <https://doi.org/10.1002/wrna.1736>

Review

The Versatile Role of miR-21 in Renal Homeostasis and Diseases

Romain Larrue ^{1,†}, Sandy Fellah ^{1,†}, Cynthia Van der Hauwaert ^{1,2}, Marie-Flore Hennino ³, Michaël Perrais ¹, Arnaud Lionet ⁴ , François Glowacki ^{1,4}, Nicolas Pottier ¹ and Christelle Cauffiez ^{1,*} 

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277—CANTHER—Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

² CHU Lille, Département de la Recherche en Santé, F-59000 Lille, France

³ CH Valenciennes, Service de Néphrologie, F-59300 Valenciennes, France

⁴ CHU Lille, Service de Néphrologie, F-59000 Lille, France

* Correspondence: christelle.cauffiez@univ-lille.fr

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNA species that control gene expression and confer robustness to biological processes. Over the last two decades, their important roles during kidney development, homeostasis and the treatment of diseases have been established, in particular during the onset and progression of various forms of acute and chronic renal disorders. In recent years, miR-21, one of the best-characterized miRNAs to date, has received much attention in renal physiology in particular given its high degree of conservation and expression in kidneys, as well as its potent pathogenic role in various debilitating renal diseases. This review summarizes the current knowledge on miR-21's involvement in both renal homeostasis and diseases, in particular its double-edged-sword role in acute versus chronic kidney injuries. Finally, we also discuss the potential of miR-21 as a biomarker and therapeutic target in renal diseases.

Keywords: microRNA; kidney; cancer; fibrosis



Citation: Larrue, R.; Fellah, S.; Van der Hauwaert, C.; Hennino, M.-F.; Perrais, M.; Lionet, A.; Glowacki, F.; Pottier, N.; Cauffiez, C. The Versatile Role of miR-21 in Renal Homeostasis and Diseases. *Cells* **2022**, *11*, 3525. <https://doi.org/10.3390/cells11213525>

Academic Editors: Hsiuying Wang and Y.-h. Taguchi

Received: 14 October 2022

Accepted: 4 November 2022

Published: 7 November 2022

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



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

1. Introduction

More than 2500 microRNAs (miRNAs) are expressed in human cells (miRbase v22.1). Some of them exhibit tissue- or cell-specific expression patterns, while others are considered as house-keeping molecules [1]. Although miRNAs were discovered in the early 1990s through the analysis of developmental timing mutants in *C. elegans* [2,3], their biological significance was underestimated until 2001, with the identification of numerous endogenously expressed small RNAs in worms, flies and mammals [4–6]. We have since learned that miRNAs represent critical gene expression regulators that control major cellular functions in various physiological and pathological settings [7]. Although a single miRNA potentially regulates the expression of multiple protein-coding genes, it is now clear that not all miRNAs are equally important. Indeed, lessons from various research studies have identified a limited number of key functional miRNAs such as miR-21, one of the most extensively studied miRNA [8]. Since its initial description in 2005 as the miRNA most commonly and strongly up-regulated in human brain tumor glioblastoma [9] miR-21 has received considerable attention, given its consistent upregulation and pathogenic role in multiple distinct disease conditions. In this review, we summarize the current knowledge of miR-21's functions in kidney diseases, with emphasis on its potential as a disease biomarker and novel therapeutic target. For easier reading, miR-21 will be used throughout the manuscript instead of hsa-miR-21-5p or mmu-miR-21a-5p.

2. miR-21's Genomic Organization, Biogenesis and Regulation

In contrast with most miRNAs which usually map in intergenic or intronic regions of coding or non-coding genes, the mature sequence of miR-21 is located immediately

downstream of the 3'-untranslated region of the coding gene VMP1 (Vacuole Membrane Protein 1), also known as TMEM49 (Transmembrane Protein 49) [10]. The gene encoding miR-21 is transcribed by RNA polymerase II independently of VMP1 into a capped, polyadenylated and unspliced primary transcript (pri-miR-21) and then processed by the RNase III enzyme Drosha to form an approximately 70 nucleotide precursor miRNA (pre-miR-21). The pre-miR-21 is then shuttled into the cytoplasm and forms the mature miRNA of 22 nucleotides following processing by a second RNase III enzyme called DICER. The mature miR-21 is then incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC), which is able to recognize the "seed sequence" of the miRNA in target mRNA and negatively regulate its expression (Figure 1) [10].

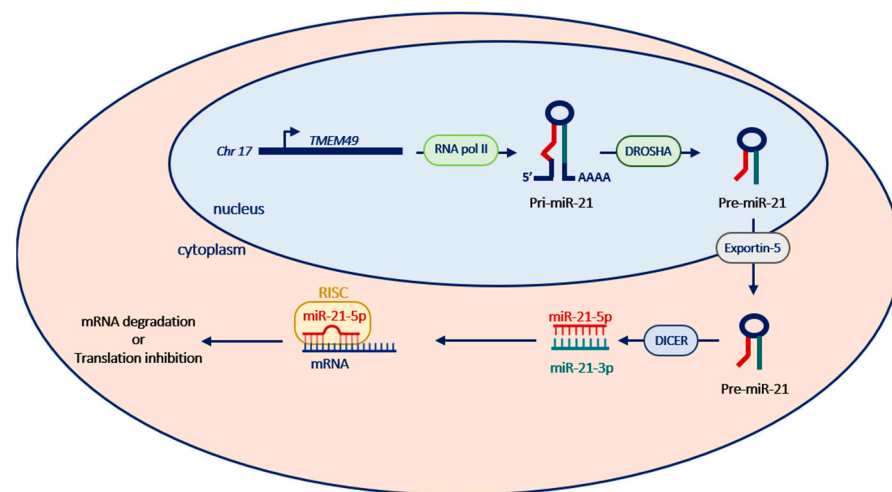


Figure 1. Biogenesis of miR-21. miR-21 is transcribed by RNA polymerase II from chromosome 17 into pri-miR-21 transcript, which is then processed by a microprocessor into hairpin precursor molecules (pre-miR-21) in the nucleus. These are exported to the cytoplasm by exportin 5 and are further processed into mature miR-21 sequences, which are then incorporated into the RISC and guided to miR-21 target mRNAs to repress their expression.

Like any other gene product, miRNAs are subject to transcriptional regulation, a fundamental process controlling gene expression [11]. Transcriptional regulation involves the complex interplay of genomic cis-regulatory elements, transcription factors, co-activator/co-repressor complexes, chromatin modifications and other epigenetic factors (Figure 2) [12].

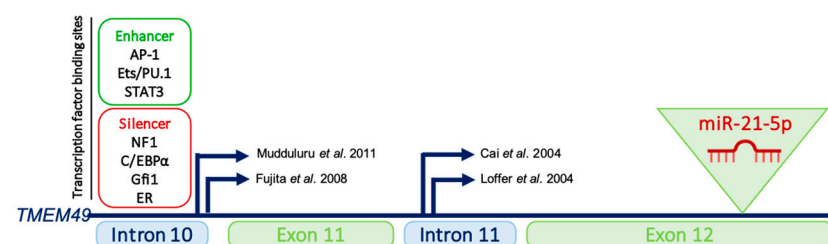


Figure 2. Genomic location of pri-miR-21. Gene encoding pri-miR-21 is located on chromosome 17q23.2 and overlaps with TMEM49, a coding gene. Two distinct transcriptional start sites with respect to the miR-21 hairpin have been described and are indicated by bent arrows [13–16]. Binding regions for transcriptional activators (AP-1, Ets/PU,1 and STAT3) and repressors (NFI, C/EBP α , Gfi1 and ER) are also shown.

Although notable exceptions exist, intergenic miRNAs are known to be transcribed as independent transcription units while intronic miRNAs are believed to be processed from the introns of their hosting transcription units, and hence share common regulatory mechanisms and expression patterns with their host gene [17]. MiR-21 is one of the very

few miRNAs which have been mapped in the 3'-untranslated regions (UTRs) of a coding gene. It is indeed located immediately adjacent to the 3'UTR of the TMEM49 gene [12]. While it was initially assumed that miR-21 was expressed as part of the TMEM49 transcript, many studies have instead experimentally shown that miR-21 and its host gene are independently regulated, and that local promoter regions initiate miR-21 transcription through long, unspliced and non-coding pri-miR-21 transcripts [18]. A detailed analysis of the upstream region of miR-21 identified several highly conserved enhancer elements, including binding sites for AP-1, Ets/PU.1 or STAT3. Experiments using heterologous luciferase have notably revealed that the PMA (phorbol myristate acetate)-induced activation of AP-1 or STAT3 activation results in the transcription of pri-miR-21 [8]. Given that these two transcription factors have well-recognized roles in tumorigenesis, up-regulated miR-21 expression in cancers may in fact reflect their aberrant tumoral expression. Furthermore, several transcriptional suppressors have also been reported, such as NF1, C/EBP α , Gfi1 and ER, indicating that miR-21 transcriptional levels are rather controlled by the balance between stimulatory and inhibitory transcription factors [19].

Epigenetic modification is another mechanism modulating miR-21 expression. For example, Baer et al., showed that the upregulation of miR-21 in chronic lymphocytic leukemia is linked to the DNA methylation of the miR-21 upstream sequence. As a matter of fact, the miR-21 promoter sequence was completely unmethylated in all leukemia samples but showed significant DNA methylation in controls [20]. Similarly, Iorio et al. demonstrated that miR-21 is strongly induced in ovarian cell line OVCAR3 treated with the demethylating agent 5-AZA [21].

In addition to transcriptional regulation, Davis and colleagues have shown that miR-21 is also subjected to post-transcriptional regulation. Indeed, they demonstrated that miR-21 expression can be induced through a SMAD-mediated increase in the Drosha processing of the pri-miR-21 transcript, and further showed that this novel regulatory mechanism is not only critical for the control of the vascular smooth muscle cell phenotype but also has functional consequences in the promotion of metastasis [22].

Mature miR-21 activity has been reported to be linked in vivo to its differential association with polysomes that reflects distinct strengths of interactions with mRNA targets according to the cellular context. For example, whereas miR-21 displays poor association with polysomes in healthy mouse hepatic tissue, associated with a low translation repression [23], a strong association of miR-21 with polysomes in HeLa cells has been shown to be related to high inhibition activity in this context [24]. A rapid and reversible regulation of miR-21 can also be mediated by a sequestration mechanism of mature miR-21 copies. Androsavitch et al. have shown that the miR-21-mRNA interaction is thermodynamically unstable due to a high adenine and uracil content within the seed sequence [23], resulting in a high sensitivity of miR-21 to "miRNA sponge" molecules that can prevent miRNA from binding to its targets. Endogenous "miRNA sponges" have previously been described. For example, GAS5 lncRNA, which has been identified as a novel target for miR-21, also contains a putative miR-21 binding site, resulting in the negative regulation of miR-21 [25,26]. In addition, pseudogenes frequently include nonsense mutations located at the beginning of the coding sequence, resulting in a short transcript that will not be supported within the polysomes. Pseudogenes-sequestered miRNAs are then located outside of the polysomes, and remain inactive. This mechanism can be illustrated by the pseudogene PTENP, which is targeted by PTEN-targeting miRNAs and could then contribute to miR-21 regulation through its sequestration [27]. Synthetic "miRNA sponges" have already been extensively used for experimental purposes in the last decades [28–32].

3. miR-21 in Kidney Development and Normal Tissue

3.1. miR-21 in Kidney Development

miRNAs are critically implicated in the development of various organs [33], including kidneys, as demonstrated by the Dicer1 conditional deletion in renal progenitor cells that results in profound defects in nephrogenesis, characterized by a very severe nephronic

reduction phenotype associated with increased apoptosis, architectural defects and 36 hr postpartum mouse mortality [34]. Moreover, Dicer conditional deletions in cortical stroma cells, podocytes and juxta-glomerular cells lead to various nephrogenesis anomalies affecting renal cells, including podocytes and tubular cells or microvascularizations [35–38].

In the zebrafish model, miR-21 expression has been reported at very-early stages of development and in relatively high amounts (up to 40% of all miRNAs in fibroblasts) [39]. However, miR-21 knock-out mice do not exhibit any pathological phenotype with normal viability and fertility, suggesting that miR-21 is not essential for normal development [40]. In particular, the mouse renal ultrastructure was strictly normal at 12 weeks of age [41].

3.2. miR-21 in Renal Regeneration

Whereas the number of mature nephrons is defined at birth in mammals, lower vertebrates (and especially fish) display nephrogenesis abilities in response to renal aggression [42]. It has been shown in particular that after renal injury, a population of progenitor cells is activated to de novo regenerate new nephrons, characterized by the presence of basophilic cells [43]. Interestingly, using the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri* model, Hoppe et al. observed an increase in miR-21 renal expression after gentamicin-induced renal injury [44]. Moreover, prior administration of a miR-21 antagonist delayed renal recovery. Gene ontology analysis reveals that most of the genes whose expression was modulated by miR-21 antagonism were linked to apoptosis at an early stage or to cellular reorganization (i.e., membrane invagination or cellular homeostasis) at a later stage [44].

3.3. miR-21 in Normal Tissue

miR-21-5p is recognized as one of the most abundant and highly conserved miRNAs. In particular, the distribution of miRNA expression across human tissues according to the “human miRNA tissue atlas” database shows its ubiquitous expression at high levels in most tissues (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas>, accessed on 31 October 2022). Whereas miR-21 is one of the most highly abundant miRNAs in tissues [8], its role under normal cellular conditions is not well understood. Indeed, following the pharmacological inhibition or genetic deletion of miR-21 in a healthy mouse, only a limited number of genes are deregulated in normal and unstressed tissues [40,45]. Moreover, a limited transcriptomic response (i.e., a lack of gene derepression) to miR-21 inhibition was observed in the livers of wild-type animals under basal conditions, as mRNA targets were not enriched for seed sequence matches. Interestingly, stress-response genes were however significantly enriched, particularly *Taf7*, a TBP-associated factor [23]. Compared with other abundant miRNAs in normal tissues, miR-21 also displays a reduced ability to bind to polysome-associated target mRNAs, and intriguingly, the derepression of the well-known miR-21 target *Pdc4* was not observed [23]. Under similar conditions, miR-21 has been described to be poorly efficient in the lungs and heart [45,46].

Taken together, these observations suggest that, under normal cellular conditions, miR-21 activity is maintained below a threshold required for binding and silencing most of its targets.

4. miR-21 in Kidney Injuries and Diseases

In contrast with normal kidney function, miR-21 switches to a powerful and overactive mediator under stress conditions [23]. In particular, miR-21 is one of the most highly upregulated miRNAs in a wide panel of tissue injuries, and may act as a cellular sensor of injuries that mediates tissue regeneration.

4.1. miR-21 in Acute and Chronic Kidney Diseases

miR-21 has been associated with the development of a large number of both acute and chronic renal diseases. The main studies investigating the contribution of miR-21 in human renal disorders are summarized in Table S1. These studies consistently report a ubiquitous and non-specific increase of miR-21 renal expression in both acute and chronic

renal diseases. Numerous experimental models have also explored the role of miR-21 using animal models of acute renal failure or chronic kidney diseases (Table S2).

4.1.1. A Protective Role of miR-21 in Acute Kidney Injury?

Acute renal diseases are mainly represented by acute tubular necrosis (ATN), whose causes, although variable, are often related to two main mechanisms: ischemia (induced by hypovolemia, hemorrhage...) and iatrogeny (aminoglycosides, iodine, renin-angiotensin system blockers, cisplatin...) [47]. The evaluation of renal miR-21 expression in clinical samples remains patchy, due to the fact that renal biopsies are rarely performed, except for in the context of renal transplantation [48]. ATN is mainly associated with an increased miR-21 level in renal tissue, serum, or urine of patients with ATN [48–51]. Furthermore, a large number of ATN-mimicking animal models rely on ischemia-reperfusion mouse models [40,49,52–60] or the administration of nephrotoxic compounds, mainly gentamycin [49,55] or cisplatin [61]. All of these models demonstrated an early increase of miR-21 renal expression [58] that may be prolonged up to 30 days after injury [52]. Following repeated low-intensity injuries, miR-21 increase could thus initially play a protective role, inducing wound healing and tissue regeneration processes by targeting PTEN [51], PDCD4 [53], PHD2 [60], the MKK3–MAPK–p38 pathway [58], thrombospondin-1 [59] and Rab11A [56]. However, there is conflicting evidence regarding the protective or deleterious nature of miR-21. Indeed, in most studies, the inhibition of miR-21 leads to histological damage worsening and decreased renal function [53,55,56] after ischemia reperfusion, even if a protective preconditioning intervention, such as cobalt chloride injection [60], Xenon inhalation [55] or ischemic preconditioning [53], was beforehand applied. By contrast, Chau et al. reported that miR-21 inhibition improves histological injuries and albuminuria seven days after ischemic injury [40]. The main elements that may explain the difference between those studies are the variable miR-21 inhibitor injection schedule and endpoints (in particular euthanasia delay post-injury). We can thus hypothesize that miR-21 plays a protective role at the early stage of ischemia-reperfusion lesions, in particular in preconditioning interventions, but plays a secondary deleterious role once ATN lesions have been initiated.

4.1.2. Sustained and Persistent Expression of miR-21 Has a Deleterious Impact in Chronic Kidney Diseases

miR-21 has been shown to be elevated in renal tissue, blood or urine in clinical samples from various pathologies (Table S1). As is consistent with most studies, a miR-21 increase is associated with more severe damages [41,62–68]. Similarly, an increased expression of miR-21 is unanimously reported in a plethora of chronic kidney disease mouse models (Table S2), underlining the deleterious role of miR-21 in chronic kidney diseases, including diabetic nephropathy [69–73], unilateral ureteral obstruction [40,69,74] and Alport syndrome [75].

It is noteworthy that most disparate diseases, such as diabetes mellitus, hypertension, Alport Syndrome or acute renal injuries, result in the development of either glomerular or interstitial fibrosis. Converging evidence from computational, biochemical and genetic experiments has indeed shown that miR-21 is a genuine profibrotic miRNA, regardless of the injured organ. In particular, miR-21 is invariably upregulated during the fibrogenic response to tissue injury and promotes the TGF- β signaling pathway, the major driver of tissue fibrosis [76]. In particular, Chau et al. produced a miR-21-null mouse to investigate the role of this miRNA in kidney fibrosis [40]. As is consistent with previous findings reported in cardiac [77] and lung fibrosis [78], injured kidneys from miR-21-deficient mice exhibited less fibrosis. Unexpectedly, the authors further showed that miR-21 primarily regulates the genes involved in lipid metabolism and mitochondrial redox regulation, rather than genes implicated in matrix turnover, inflammation or innate immunity. Indeed, the authors identified PPAR- α , a major transcription factor that regulates a number of lipid oxidation and metabolism pathways, and Mpv17l, which is thought to inhibit ROS formation by mitochondria, as direct targets of miR-21 [40]. This distinct mechanism was

explained by the identification of epithelial cells as the major cellular source of increased miR-21 expression. Of particular interest, this study highlights that miR-21 can drive fibrogenesis by several distinct mechanisms, depending on the cellular context (Figure 3).

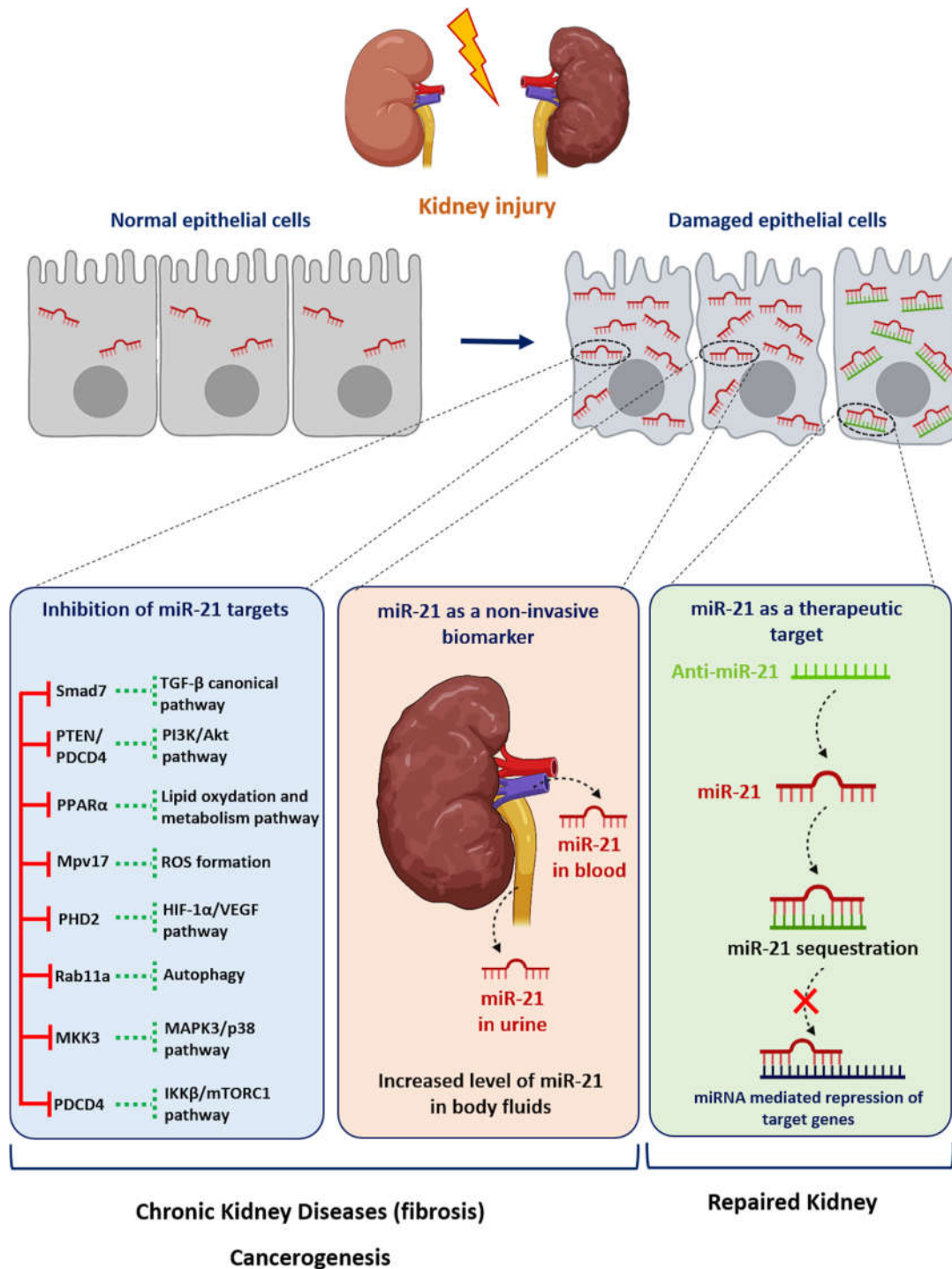


Figure 3. Role of miR-21 in kidney diseases. Following injury, the expression of miR-21 is increased in renal cells. miR-21 promotes kidney diseases by repressing various target genes. Levels of miR-21 can be assessed in urine or blood samples as a biomarker of kidney injury. Given its established pathogenic role in kidney disorders, targeting miR-21 using antisense oligonucleotides may represent a new therapeutic strategy for renal diseases.

4.2. miR-21 as an “oncomiR”

miRNAs influence numerous cellular processes, including cell cycle regulation, differentiation and apoptosis, and can therefore act as either tumor suppressors or oncogenes [79]. Consequently, alterations in miRNA gene expression have a major impact on tumorigenesis. In particular, the overexpression of miR-21 is associated with many forms of cancer, and functional studies have established this miRNA as a genuine oncomiR (Figure 3). Indeed, many studies have demonstrated that miR-21 has a central role in tumor initiation and progression by targeting critical tumor suppressive genes, such as PTEN or PDCD4. Not surprisingly, comprehensive studies assessing miRNA expression in renal cell carcinoma (RCC) have shown widespread miRNA dysregulation, with many of these aberrantly expressed miRNAs targeting components of key oncogenic networks associated with RCC, including the HIF-, TGF- β - or mTOR-signaling pathways. Several studies on RCC have shown that miR-21 is overexpressed in the clear cell (cRCC) and papillary (pRCC) subtypes of RCC tumors compared with healthy kidneys and benign renal tumors [79–85]. In cRCC tissue patients, there is no relationship between miR-21 expression and age, laterality or gender [84,85]. Chen et al. have shown, in a cohort of 104 RCC tissue samples, that a higher miR-21 level is associated with larger tumor size, more lymph node metastasis and an advanced TNM stage [85]. In contrast, another study has shown in a cohort of 99 cRCC tissue samples that miR-21 expression was not associated with stage, nuclear Fürhman grade nor patient outcome [84]. Thus, miR-21 expression alone in primary tumors seems of limited interest as a diagnostic or a prognostic biomarker, and should rather be included in miRNA signature [86–89]. Furthermore, miR-21 is also detected in RCC patient serums, and could be used as biomarker but only in combination with other miRNAs, such as miR-106a, miR-310-3p, miR-150-5p and miR-145-5p [90–92]. cRCC accounts for 70–85% of all RCC cases, and is typically highly resistant to conventional therapies [93,94]. Studies from the TCGA uncovered that the altered promoter methylation of miR-21 is associated with aggressive cRCC, suggesting that miR-21 may exert an important oncogenic function in this neoplasia [81,95]. miR-21 is not only upregulated in cRCC but is also involved in cancer progression (proliferation, migration, invasion, epithelial mesenchymal transition) and the cancer stem cell phenotype by targeting tumor suppressor genes such as PTEN, PDCD4, TIMP3 or LATS1 [84,85,96–104]. As cRCC is typically highly resistant to conventional systemic therapies [93,94], the identification of new molecular mechanisms driving tumor progression is essential for the rational design of new therapeutic strategies to cure cRCC. In this context, miR-21 has been shown to be involved in the resistance to conventional chemotherapies (paclitaxel, 5-Fluorouracil, topotecan and platinum-based therapy) and targeted therapies such as dovitinib and sorafenib by controlling the expression of genes associated with multi-drug resistance (MDR) and the apoptotic pathway (PTEN, PDCD4) [85,105,106]. Similar to renal fibrosis, miR-21 seems to also be involved in the metabolic shift characterizing renal cancer by targeting PPAR- α , a master regulator of lipid metabolism [107]. miR-21 silencing using antisense oligonucleotide or miR-21 sponge strategies decreases the proliferation, invasion and migration of cRCC cells and also increases the expression of pro-apoptotic markers. Furthermore, the inhibition of miR-21 enhances the sensitivity of cRCC cells to conventional genotoxic drugs, as well as to targeted therapies [84,105,106]. Finally, the inhibition of miR-21 also decreases the expression of MDR genes by a mechanism that remains to be deciphered.

5. Potential of miR-21 as a Therapeutic Target

The concept of RNA-based therapeutics was conceived over four decades ago when Zamencnik et al. demonstrated that an oligonucleotide directed against the Rous sarcoma virus (RSV) 35S RNA can efficiently inhibit RSV replication [108]. However, the first generation of antisense oligonucleotides (ASOs) showed little therapeutic benefit, given the issues with their short half-lives, suboptimal affinity for mRNA and poor tissue penetration. Recently, the explosion in ncRNA research has renewed interest in developing ASO therapy, and substantial progress has been made in the therapeutic development of ASO with, in par-

ticular, cost-effective methods for the synthesis of oligonucleotides and the demonstration that chemical modifications improve the pharmacokinetics properties of these molecules while reducing off-target effects and toxicity. These modifications notably include the use of 2'-O-methyl RNA molecules, the replacement of the phosphodiester backbone with a phosphorothioate backbone, and the use of locked bicyclic nucleic acids [32,109]. Additionally, linking these modified RNA molecules to lipids or other moieties improves delivery by enabling targeting to various tissues or even to specific cell types. Furthermore, modifications of the native RNA backbone reduced the type I interferon response, which is usually induced in response to exposure to extracellular RNA or DNA [32,109]. High concentrations of ASO are usually found in the kidney after systemic administration, in particular in the proximal tubule. Moreover, it has also been shown that the diseased glomerulus also accumulate ASO in all cell types. These findings indicate that this therapeutic strategy may be beneficial in both glomerular and tubulointerstitial diseases [110].

Given that aberrant miRNA expression has been causatively linked to a vast array of chronic diseases, the development of miRNA-based therapies has become a major goal of the current research. Indeed, over the last decade, several miRNA targets have emerged on the basis of strong *in vitro* and *in vivo* data, and drugs targeting canonical miRNAs have been developed or are in development to treat specific patient populations with chronic or rare diseases. Of these miRNAs, miR-21 has received particular attention given its abundant baseline expression and strong induction in various physio-pathological conditions, including development, oncology, stem cell biology and ageing. In particular, the successful pharmacological silencing of miR-21 has been achieved in various experimental models of AKI, as well as in chronic glomerular and tubulointerstitial diseases. This includes in particular common kidney disorders such as diabetic nephropathy or renal fibrosis as, well as rare renal diseases such as Alport syndrome [40,69]. For example, the targeting of miR-21 in a genetic rodent model of Alport nephropathy significantly improved albuminuria, renal inflammation, glomerulosclerosis, tubular injury and interstitial fibrosis, as well as survival [75]. Interestingly, these preclinical results gave rise to the development of Lademirsen, an inhibitor of miR-21 currently under investigation for the treatment of Alport syndrome (NCT02855268).

However, the targeting of miR-21 is fraught with many challenges, especially tissue delivery or the determination of the optimal drug concentration to minimize off-target effects without compromising effectiveness. This is of particular importance given the ubiquitous and high expression of miR-21. For example, the systemic delivery of miR-21 ASO-therapy may expose patients to unintended side effects in extrarenal tissues despite an improvement in kidney function. Nevertheless, preliminary results from a phase I clinical trial using miR-21 antagonists in healthy volunteers showed that this drug was well tolerated [111].

6. Conclusions

These examples illustrate the complex role of miR-21 during renal insults. They are in favor of a protective role of miR-21 in the initial phase of an aggression (in particular in pre-conditioning) protecting from subsequent renal damage, but deleterious in chronicity. The exploration of the underlying molecular mechanisms, and in particular the identification of the targets of miR-21, could improve the understanding of the ambivalent role of miR-21. To conclude, although miR-21-5p has an established role in renal disorders, its diagnostic use as biomarker is questionable, given the lack of specificity of its dysregulation. Indeed, it is now well known that dysregulation of miR-21-5p is associated with many renal and extrarenal diseases. Therefore, the therapeutic targeting of miR-21 seems to be a more reasonable approach, and should be the focus of future research studies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11213525/s1>, Table S1: implication of miR-21-5p in human renal pathologies; Table S2: implication of miR-21a-5p in animal models of acute and chronic renal pathologies.

Author Contributions: Conceptualization, N.P. and C.C.; Original draft preparation, R.L., S.F., C.V.d.H., M.P., N.P. and C.C.; Review and editing, A.L., M.-F.H., F.G., N.P. and C.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The APC was funded by Inserm.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ludwig, N.; Leidinger, P.; Becker, K.; Backes, C.; Fehlmann, T.; Pallasch, C.; Rheinheimer, S.; Meder, B.; Stähler, C.; Meese, E.; et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 3865–3877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **1993**, *75*, 843–854. [[CrossRef](#)]
- Wightman, B.; Ha, I.; Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **1993**, *75*, 855–862. [[CrossRef](#)]
- Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **2001**, *294*, 853–858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lau, N.C.; Lim, L.P.; Weinstein, E.G.; Bartel, D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **2001**, *294*, 858–862. [[CrossRef](#)]
- Lee, R.C.; Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **2001**, *294*, 862–864. [[CrossRef](#)]
- Bartel, D.P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* **2018**, *173*, 20–51. [[CrossRef](#)]
- Krichevsky, A.M.; Gabriely, G. miR-21: A small multi-faceted RNA. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 39–53. [[CrossRef](#)]
- Chan, J.A.; Krichevsky, A.M.; Kosik, K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6029–6033. [[CrossRef](#)]
- Ribas, J.; Ni, X.; Castanares, M.; Liu, M.M.; Esopi, D.; Yegnasubramanian, S.; Rodriguez, R.; Mendell, J.T.; Lupold, S.E. A novel source for miR-21 expression through the alternative polyadenylation of VMP1 gene transcripts. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6821–6833. [[CrossRef](#)]
- Suster, I.; Feng, Y. Multifaceted Regulation of MicroRNA Biogenesis: Essential Roles and Functional Integration in Neuronal and Glial Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Agrawal, P.; Heimbruch, K.E.; Rao, S. Genome-Wide Maps of Transcription Regulatory Elements and Transcription Enhancers in Development and Disease. *Compr. Physiol.* **2018**, *9*, 439–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mudduluru, G.; George-William, J.N.; Muppala, S.; Asangani, I.A.; Kumarswamy, R.; Nelson, L.D.; Allgayer, H. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci. Rep.* **2011**, *31*, 185–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fujita, S.; Ito, T.; Mizutani, T.; Minoguchi, S.; Yamamichi, N.; Sakurai, K.; Iba, H. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J. Mol. Biol.* **2008**, *378*, 492–504. [[CrossRef](#)]
- Cai, X.; Hagedorn, C.H.; Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **2004**, *10*, 1957–1966. [[CrossRef](#)]
- Löffler, D.; Brocke-Heidrich, K.; Pfeifer, G.; Stocsits, C.; Hackermüller, J.; Kretzschmar, A.K.; Burger, R.; Gramatzki, M.; Blumert, C.; Bauer, K.; et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* **2007**, *110*, 1330–1333. [[CrossRef](#)]
- Ramalingam, P.; Palanichamy, J.K.; Singh, A.; Das, P.; Bhagat, M.; Kassab, M.A.; Sinha, S.; Chattopadhyay, P. Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *RNA* **2014**, *20*, 76–87. [[CrossRef](#)]
- Kumarswamy, R.; Volkmann, I.; Thum, T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol.* **2011**, *8*, 706–713. [[CrossRef](#)]
- Velu, C.S.; Baktula, A.M.; Grimes, H.L. Gfi1 regulates miR-21 and miR-196b to control myelopoiesis. *Blood* **2009**, *113*, 4720–4728. [[CrossRef](#)]
- Baer, C.; Claus, R.; Frenzel, L.P.; Zucknick, M.; Park, Y.J.; Gu, L.; Weichenhan, D.; Fischer, M.; Pallasch, C.P.; Herpel, E.; et al. Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3775–3785. [[CrossRef](#)]
- Iorio, M.V.; Visone, R.; Di Leva, G.; Donati, V.; Petrocca, F.; Casalini, P.; Taccioli, C.; Volinia, S.; Liu, C.G.; Alder, H.; et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8699–8707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Davis, B.N.; Hilyard, A.C.; Nguyen, P.H.; Lagna, G.; Hata, A. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 373–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Androsavich, J.R.; Chau, B.N.; Bhat, B.; Linsley, P.S.; Walter, N.G. Disease-linked microRNA-21 exhibits drastically reduced mRNA binding and silencing activity in healthy mouse liver. *RNA* **2012**, *18*, 1510–1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Maroney, P.A.; Yu, Y.; Fisher, J.; Nilsen, T.W. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 1102–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pickard, M.R.; Williams, G.T. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA. *Genes* **2015**, *6*, 484–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Zhang, Z.; Zhu, Z.; Watabe, K.; Zhang, X.; Bai, C.; Xu, M.; Wu, F.; Mo, Y.Y. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21. *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 1558–1568. [[CrossRef](#)]
27. Poliseno, L.; Salmena, L.; Zhang, J.; Carver, B.; Haveman, W.J.; Pandolfi, P.P. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* **2010**, *465*, 1033–1038. [[CrossRef](#)]
28. Ebert, M.S.; Sharp, P.A. MicroRNA sponges: Progress and possibilities. *RNA* **2010**, *16*, 2043–2050. [[CrossRef](#)]
29. Ebert, M.S.; Neilson, J.R.; Sharp, P.A. MicroRNA sponges: Competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 721–726. [[CrossRef](#)]
30. Sayed, D.; Abdellatif, M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 827–887. [[CrossRef](#)]
31. Du, C.; Liu, C.; Kang, J.; Zhao, G.; Ye, Z.; Huang, S.; Li, Z.; Wu, Z.; Pei, G. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 1252–1259, Erratum in *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pottier, N.; Cauffiez, C.; Perrais, M.; Barbry, P.; Mari, B. FibromiRs: Translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 119–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Laurent, L.C. MicroRNAs in embryonic stem cells and early embryonic development. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 2181–2188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nagalakshmi, V.K.; Ren, Q.; Pugh, M.M.; Valerius, M.T.; McMahon, A.P.; Yu, J. Dicer regulates the development of nephrogenic and ureteric compartments in the mammalian kidney. *Kidney Int.* **2011**, *79*, 317–330. [[CrossRef](#)]
35. Nakagawa, N.; Xin, C.; Roach, A.M.; Naiman, N.; Shankland, S.J.; Ligresti, G.; Ren, S.; Szak, S.; Gomez, I.G.; Duffield, J.S. Dicer1 activity in the stromal compartment regulates nephron differentiation and vascular patterning during mammalian kidney organogenesis. *Kidney Int.* **2015**, *87*, 1125–1140. [[CrossRef](#)]
36. Ho, J.; Ng, K.H.; Rosen, S.; Dostal, A.; Gregory, R.I.; Kreidberg, J.A. Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19*, 2069–2075. [[CrossRef](#)]
37. Harvey, S.J.; Jarad, G.; Cunningham, J.; Goldberg, S.; Schermer, B.; Harfe, B.D.; McManus, M.T.; Benzing, T.; Miner, J.H. Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19*, 2150–2158. [[CrossRef](#)]
38. Sequeira-Lopez, M.L.; Weatherford, E.T.; Borges, G.R.; Monteagudo, M.C.; Pentz, E.S.; Harfe, B.D.; Carretero, O.; Sigmund, C.D.; Gomez, R.A. The microRNA-processing enzyme dicer maintains juxtaglomerular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 460–467. [[CrossRef](#)]
39. Chen, P.Y.; Manning, H.; Slanchev, K.; Chien, M.; Russo, J.J.; Ju, J.; Sheridan, R.; John, B.; Marks, D.S.; Gaidatzis, D.; et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1288–1293. [[CrossRef](#)]
40. Chau, B.N.; Xin, C.; Hartner, J.; Ren, S.; Castano, A.P.; Linn, G.; Li, J.; Tran, P.T.; Kaimal, V.; Huang, X.; et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 121ra18. [[CrossRef](#)]
41. Lai, J.Y.; Luo, J.; O'Connor, C.; Jing, X.; Nair, V.; Ju, W.; Randolph, A.; Ben-Dov, I.Z.; Matar, R.N.; Briskin, D.; et al. MicroRNA-21 in glomerular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 805–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Salice, C.J.; Rokous, J.S.; Kane, A.S.; Reimschuessel, R. New nephron development in goldfish (*Carassius auratus*) kidneys following repeated gentamicin-induced nephrotoxicosis. *Comp. Med.* **2001**, *51*, 56–59. [[PubMed](#)]
43. Diep, C.Q.; Ma, D.; Deo, R.C.; Holm, T.M.; Naylor, R.W.; Arora, N.; Wingert, R.A.; Bollig, F.; Djordjevic, G.; Lichman, B.; et al. Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. *Nature* **2011**, *470*, 95–100. [[CrossRef](#)]
44. Hoppe, B.; Pietsch, S.; Franke, M.; Engel, S.; Groth, M.; Platzer, M.; Englert, C. MiR-21 is required for efficient kidney regeneration in fish. *BMC Dev. Biol.* **2015**, *15*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Patrick, D.M.; Montgomery, R.L.; Qi, X.; Obad, S.; Kauppinen, S.; Hill, J.A.; van Rooij, E.; Olson, E.N. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 3912–3916. [[CrossRef](#)]
46. Hatley, M.E.; Patrick, D.M.; Garcia, M.R.; Richardson, J.A.; Bassel-Duby, R.; van Rooij, E.; Olson, E.N. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* **2010**, *18*, 282–293. [[CrossRef](#)]
47. Pickkers, P.; Ostermann, M.; Joannidis, M.; Zarbock, A.; Hoste, E.; Bellomo, R.; Prowle, J.; Darmon, M.; Bonventre, J.V.; Forni, L.; et al. The intensive care medicine agenda on acute kidney injury. *Intensive Care Med.* **2017**, *43*, 1198–1209. [[CrossRef](#)]
48. Pavkovic, M.; Robinson-Cohen, C.; Chua, A.S.; Nicoara, O.; Cárdenas-González, M.; Bijol, V.; Ramachandran, K.; Hampson, L.; Pirmohamed, M.; Antoine, D.J.; et al. Detection of Drug-Induced Acute Kidney Injury in Humans Using Urinary KIM-1, miR-21, -200c, and -423. *Toxicol. Sci.* **2016**, *152*, 205–213. [[CrossRef](#)]
49. Saikumar, J.; Hoffmann, D.; Kim, T.M.; Gonzalez, V.R.; Zhang, Q.; Goering, P.L.; Brown, R.P.; Bijol, V.; Park, P.J.; Waikar, S.S.; et al. Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury. *Toxicol. Sci.* **2012**, *129*, 256–267. [[CrossRef](#)]
50. Du, J.; Cao, X.; Zou, L.; Chen, Y.; Guo, J.; Chen, Z.; Hu, S.; Zheng, Z. MicroRNA-21 and risk of severe acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63390. [[CrossRef](#)]
51. Ramachandran, K.; Saikumar, J.; Bijol, V.; Koyner, J.L.; Qian, J.; Betensky, R.A.; Waikar, S.S.; Vaidya, V.S. Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury. *Clin. Chem.* **2013**, *59*, 1742–1752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Godwin, J.G.; Ge, X.; Stephan, K.; Jurisch, A.; Tullius, S.G.; Iacomini, J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 14339–14344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Xu, X.; Kriegel, A.J.; Liu, Y.; Usa, K.; Mladinov, D.; Liu, H.; Fang, Y.; Ding, X.; Liang, M. Delayed ischemic preconditioning contributes to renal protection by upregulation of miR-21. *Kidney Int.* **2012**, *82*, 1167–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kaucsár, T.; Révész, C.; Godó, M.; Krenács, T.; Albert, M.; Szalay, C.I.; Rosivall, L.; Benyó, Z.; Bátkai, S.; Thum, T.; et al. Activation of the miR-17 family and miR-21 during murine kidney ischemia-reperfusion injury. *Nucleic Acid Ther.* **2013**, *23*, 344–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Jia, P.; Teng, J.; Zou, J.; Fang, Y.; Zhang, X.; Bosnjak, Z.J.; Liang, M.; Ding, X. miR-21 contributes to xenon-conferred amelioration of renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Anesthesiology* **2013**, *119*, 621–630. [[CrossRef](#)]
56. Liu, X.; Hong, Q.; Wang, Z.; Yu, Y.; Zou, X.; Xu, L. MiR-21 inhibits autophagy by targeting Rab11a in renal ischemia/reperfusion. *Exp. Cell Res.* **2015**, *338*, 64–69. [[CrossRef](#)]
57. Chen, X.; Wang, C.C.; Song, S.M.; Wei, S.Y.; Li, J.S.; Zhao, S.L.; Li, B. The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/ β -catenin signaling. *J. Formos. Med. Assoc.* **2015**, *114*, 430–437. [[CrossRef](#)]
58. Li, Z.; Deng, X.; Kang, Z.; Wang, Y.; Xia, T.; Ding, N.; Yin, Y. Elevation of miR-21, through targeting MKK3, may be involved in ischemia pretreatment protection from ischemia-reperfusion induced kidney injury. *J. Nephrol.* **2016**, *29*, 27–36. [[CrossRef](#)]
59. Xu, X.; Song, N.; Zhang, X.; Jiao, X.; Hu, J.; Liang, M.; Teng, J.; Ding, X. Renal Protection Mediated by Hypoxia Inducible Factor-1 α Depends on Proangiogenesis Function of miR-21 by Targeting Thrombospondin 1. *Transplantation* **2017**, *101*, 1811–1819. [[CrossRef](#)]
60. Jiao, X.; Xu, X.; Fang, Y.; Zhang, H.; Liang, M.; Teng, J.; Ding, X. miR-21 contributes to renal protection by targeting prolyl hydroxylase domain protein 2 in delayed ischaemic preconditioning. *Nephrology* **2017**, *22*, 366–373. [[CrossRef](#)]
61. Pavkovic, M.; Riefke, B.; Ellinger-Ziegelbauer, H. Urinary microRNA profiling for identification of biomarkers after cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology* **2014**, *324*, 147–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ben-Dov, I.Z.; Muthukumar, T.; Morozov, P.; Mueller, F.B.; Tuschl, T.; Suthanthiran, M. MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation* **2012**, *94*, 1086–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Glowacki, F.; Savary, G.; Gnemmi, V.; Buob, D.; Van der Hauwaert, C.; Lo-Guidice, J.M.; Bouyé, S.; Hazzan, M.; Pottier, N.; Perrais, M.; et al. Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bao, H.; Hu, S.; Zhang, C.; Shi, S.; Qin, W.; Zeng, C.; Zen, K.; Liu, Z. Inhibition of miRNA-21 prevents fibrogenic activation in podocytes and tubular cells in IgA nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *444*, 455–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. McClelland, A.D.; Herman-Edelstein, M.; Komers, R.; Jha, J.C.; Winbanks, C.E.; Hagiwara, S.; Gregorevic, P.; Kantharidis, P.; Cooper, M.E. miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7. *Clin. Sci.* **2015**, *129*, 1237–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Pezzolesi, M.G.; Satake, E.; McDonnell, K.P.; Major, M.; Smiles, A.M.; Krolewski, A.S. Circulating TGF- β 1-Regulated miRNAs and the Risk of Rapid Progression to ESRD in Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2015**, *64*, 3285–3293. [[CrossRef](#)]
67. Zununi Vahed, S.; Omidi, Y.; Ardalan, M.; Samadi, N. Dysregulation of urinary miR-21 and miR-200b associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) in renal transplant recipients. *Clin. Biochem.* **2017**, *50*, 32–39. [[CrossRef](#)]
68. Hennino, M.F.; Buob, D.; Van der Hauwaert, C.; Gnemmi, V.; Jomaa, Z.; Pottier, N.; Savary, G.; Drumez, E.; Noël, C.; Cauffiez, C.; et al. miR-21-5p renal expression is associated with fibrosis and renal survival in patients with IgA nephropathy. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27209. [[CrossRef](#)]
69. Zhong, X.; Chung, A.C.; Chen, H.Y.; Meng, X.M.; Lan, H.Y. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 1668–1681. [[CrossRef](#)]
70. Wang, J.; Gao, Y.; Ma, M.; Li, M.; Zou, D.; Yang, J.; Zhu, Z.; Zhao, X. Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *67*, 537–546. [[CrossRef](#)]
71. Wang, J.Y.; Gao, Y.B.; Zhang, N.; Zou, D.W.; Wang, P.; Zhu, Z.Y.; Li, J.Y.; Zhou, S.N.; Wang, S.C.; Wang, Y.Y.; et al. miR-21 overexpression enhances TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition by target smad7 and aggravates renal damage in diabetic nephropathy. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *392*, 163–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Wang, J.; Duan, L.; Tian, L.; Liu, J.; Wang, S.; Gao, Y.; Yang, J. Serum miR-21 may be a Potential Diagnostic Biomarker for Diabetic Nephropathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2016**, *124*, 417–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Wu, H.; Kong, L.; Tan, Y.; Epstein, P.N.; Zeng, J.; Gu, J.; Liang, G.; Kong, M.; Chen, X.; Miao, L.; et al. C66 ameliorates diabetic nephropathy in mice by both upregulating NRF2 function via increase in miR-200a and inhibiting miR-21. *Diabetologia* **2016**, *59*, 1558–1568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zarjou, A.; Yang, S.; Abraham, E.; Agarwal, A.; Liu, G. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: Role of miR-21. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2011**, *301*, F793–F801. [[CrossRef](#)]
75. Gomez, I.G.; MacKenna, D.A.; Johnson, B.G.; Kaimal, V.; Roach, A.M.; Ren, S.; Nakagawa, N.; Xin, C.; Newitt, R.; Pandya, S.; et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 141–156. [[CrossRef](#)]
76. Huang, Y.; He, Y.; Li, J. MicroRNA-21: A central regulator of fibrotic diseases via various targets. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 2236–2242. [[CrossRef](#)]
77. Thum, T.; Gross, C.; Fiedler, J.; Fischer, T.; Kissler, S.; Bussen, M.; Galuppo, P.; Just, S.; Rottbauer, W.; Frantz, S.; et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* **2008**, *456*, 980–984. [[CrossRef](#)]

78. Liu, G.; Friggeri, A.; Yang, Y.; Milosevic, J.; Ding, Q.; Thannickal, V.J.; Kaminski, N.; Abraham, E. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 1589–1597. [[CrossRef](#)]
79. Winter, J.; Jung, S.; Keller, S.; Gregory, R.I.; Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 228–234. [[CrossRef](#)]
80. Faragalla, H.; Youssef, Y.M.; Scorilas, A.; Khalil, B.; White, N.M.; Mejia-Guerrero, S.; Khella, H.; Jewett, M.A.; Evans, A.; Lichner, Z.; et al. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma. *J. Mol. Diagn.* **2012**, *14*, 385–392. [[CrossRef](#)]
81. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **2014**, *513*, 202–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Kowalczyk, A.E.; Krazinski, B.E.; Godlewski, J.; Grzegorzolka, J.; Kiewisz, J.; Kwiatkowski, P.; Sliwinska-Jewsiewicka, A.; Dziegiel, P.; Kmiec, Z. SATB1 is Down-regulated in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Correlates with miR-21-5p Overexpression and Poor Prognosis. *Cancer Genom. Proteom.* **2016**, *13*, 209–217.
83. Petrozza, V.; Carbone, A.; Bellissimo, T.; Porta, N.; Palleschi, G.; Pastore, A.L.; Di Carlo, A.; Della Rocca, C.; Fazi, F. Oncogenic MicroRNAs Characterization in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29219–29225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Gaudelot, K.; Gibier, J.B.; Pottier, N.; Hémon, B.; Van Seuningen, I.; Glowacki, F.; Leroy, X.; Cauffiez, C.; Gnemmi, V.; Aubert, S.; et al. Targeting miR-21 decreases expression of multi-drug resistant genes and promotes chemosensitivity of renal carcinoma. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317707372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Chen, J.; Gu, Y.; Shen, W. MicroRNA-21 functions as an oncogene and promotes cell proliferation and invasion via TIMP3 in renal cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21*, 4566–4576. [[PubMed](#)]
86. Tang, K.; Xu, H. Prognostic value of meta-signature miRNAs in renal cell carcinoma: An integrated miRNA expression profiling analysis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10272. [[CrossRef](#)]
87. Huang, M.; Zhang, T.; Yao, Z.Y.; Xing, C.; Wu, Q.; Liu, Y.W.; Xing, X.L. MicroRNA related prognosis biomarkers from high throughput sequencing data of kidney renal clear cell carcinoma. *BMC Med. Genom.* **2021**, *14*, 72. [[CrossRef](#)]
88. Guo, Y.; Li, X.; Zheng, J.; Fang, J.; Pan, G.; Chen, Z. Identification of a novel immune-related microRNA prognostic model in clear cell renal cell carcinoma. *Transl. Androl. Urol.* **2021**, *10*, 888–899. [[CrossRef](#)]
89. Zhao, Y.; Tao, Z.; Chen, X. Identification of the miRNA-mRNA regulatory pathways and a miR-21-5p based nomogram model in clear cell renal cell carcinoma. *PeerJ* **2020**, *8*, e10292. [[CrossRef](#)]
90. Tusong, H.; Maolakuerban, N.; Guan, J.; Rexiati, M.; Wang, W.G.; Azhati, B.; Nuerrula, Y.; Wang, Y.J. Functional analysis of serum microRNAs miR-21 and miR-106a in renal cell carcinoma. *Cancer Biomark.* **2017**, *18*, 79–85. [[CrossRef](#)]
91. Kalogirou, C.; Ellinger, J.; Kristiansen, G.; Hatzichristodoulou, G.; Kübler, H.; Kneitz, B.; Busch, J.; Fendler, A. Identification of miR-21-5p and miR-210-3p serum levels as biomarkers for patients with papillary renal cell carcinoma: A multicenter analysis. *Transl. Androl. Urol.* **2020**, *9*, 1314–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Chen, X.; Li, R.; Li, X.; Peng, X.; Zhang, C.; Liu, K.; Huang, G.; Lai, Y. Identification of a four-microRNA panel in serum for screening renal cell carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* **2021**, *227*, 153625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Hsieh, J.J.; Purdue, M.P.; Signoretti, S.; Swanton, C.; Albiges, L.; Schmidinger, M.; Heng, D.Y.; Larkin, J.; Ficarra, V. Renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Wettersten, H.I.; Aboud, O.A.; Lara, P.N., Jr.; Weiss, R.H. Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Nephrol.* **2017**, *13*, 410–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Lu, J.; Tan, T.; Zhu, L.; Dong, H.; Xian, R. Hypomethylation Causes MIR21 Overexpression in Tumors. *Mol. Ther. Oncolytics* **2020**, *18*, 47–57. [[CrossRef](#)]
96. Wu, T.K.; Wei, C.W.; Pan, Y.R.; Hsu, R.J.; Wu, C.Y.; Yu, Y.L. The uremic toxin p-cresyl sulfate induces proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma via microRNA-21/ HIF-1 α axis signals. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3207. [[CrossRef](#)]
97. An, F.; Liu, Y.; Hu, Y. miR-21 inhibition of LATS1 promotes proliferation and metastasis of renal cancer cells and tumor stem cell phenotype. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 4684–4688. [[CrossRef](#)]
98. Yuan, H.; Xin, S.; Huang, Y.; Bao, Y.; Jiang, H.; Zhou, L.; Ren, X.; Li, L.; Wang, Q.; Zhang, J. Downregulation of PDCD4 by miR-21 suppresses tumor transformation and proliferation in a nude mouse renal cancer model. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 3371–3378. [[CrossRef](#)]
99. Cao, J.; Liu, J.; Xu, R.; Zhu, X.; Liu, L.; Zhao, X. MicroRNA-21 stimulates epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenesis in clear cell renal cells. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 75–82. [[CrossRef](#)]
100. Li, X.; Xin, S.; He, Z.; Che, X.; Wang, J.; Xiao, X.; Chen, J.; Song, X. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and promotes cell transformation, proliferation, and metastasis in renal cell carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 1631–1642. [[CrossRef](#)]
101. Bera, A.; Ghosh-Choudhury, N.; Dey, N.; Das, F.; Kasinath, B.S.; Abboud, H.E.; Choudhury, G.G. NF κ B-mediated cyclin D1 expression by microRNA-21 influences renal cancer cell proliferation. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 2575–2586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Bera, A.; Das, F.; Ghosh-Choudhury, N.; Kasinath, B.S.; Abboud, H.E.; Choudhury, G.G. microRNA-21-induced dissociation of PDCD4 from rictor contributes to Akt-IKK β -mTORC1 axis to regulate renal cancer cell invasion. *Exp. Cell Res.* **2014**, *328*, 99–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

103. Dey, N.; Das, F.; Ghosh-Choudhury, N.; Mandal, C.C.; Parekh, D.J.; Block, K.; Kasinath, B.S.; Abboud, H.E.; Choudhury, G.G. microRNA-21 governs TORC1 activation in renal cancer cell proliferation and invasion. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Zhang, H.; Guo, Y.; Shang, C.; Song, Y.; Wu, B. miR-21 downregulated TCF21 to inhibit KISS1 in renal cancer. *Urology* **2012**, *80*, 1298–1302.e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Naro, Y.; Ankenbruck, N.; Thomas, M.; Tivon, Y.; Connelly, C.M.; Gardner, L.; Deiters, A. Small Molecule Inhibition of MicroRNA miR-21 Rescues Chemosensitivity of Renal-Cell Carcinoma to Topotecan. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5900–5909. [[CrossRef](#)]
106. Liu, L.; Pang, X.; Shang, W.; Xie, H.; Feng, Y.; Feng, G. Long non-coding RNA GAS5 sensitizes renal cell carcinoma to sorafenib via miR-21/SOX5 pathway. *Cell Cycle* **2019**, *18*, 257–263. [[CrossRef](#)]
107. Goujon, M.; Woszczyk, J.; Gaudelot, K.; Swierczewski, T.; Fella, S.; Gibier, J.B.; Van Seuning, I.; Larrue, R.; Cauffiez, C.; Gnemmi, V.; et al. A Double-Negative Feedback Interaction between miR-21 and PPAR- α in Clear Renal Cell Carcinoma. *Cancers* **2022**, *14*, 795. [[CrossRef](#)]
108. Zamecnik, P.C.; Stephenson, M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280–284. [[CrossRef](#)]
109. Fella, S.; Larrue, R.; Truchi, M.; Vassaux, G.; Mari, B.; Cauffiez, C.; Pottier, N. Pervasive role of the long noncoding RNA DNMT3OS in development and diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2022**, e1736. [[CrossRef](#)]
110. Gomez, I.G.; Nakagawa, N.; Duffield, J.S. MicroRNAs as novel therapeutic targets to treat kidney injury and fibrosis. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2016**, *310*, F931–F944. [[CrossRef](#)]
111. Kölling, M.; Kaucsar, T.; Schauerte, C.; Hübner, A.; Dettling, A.; Park, J.K.; Busch, M.; Wulff, X.; Meier, M.; Scherf, K.; et al. Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 165–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

ARTICLE OPEN



miR-92a-3p regulates cisplatin-induced cancer cell death

Romain Larrue^{1,3}, Sandy Fellah^{1,3}, Nihad Boukrout¹, Corentin De Sousa¹, Julie Lemaire¹, Carolane Leboeuf¹, Marine Goujon¹, Michael Perrais¹, Bernard Mari², Christelle Cauffiez¹, Nicolas Pottier^{1,4} and Cynthia Van der Hauwaert^{1,4}✉

© The Author(s) 2023

Non-small cell lung cancer is characterized by a dismal prognosis largely owing to inefficient diagnosis and tenacious drug resistance. Therefore, the identification of new molecular determinants underlying sensitivity of cancer cells to existing therapy is of particular importance to develop new effective combinatorial treatment strategy. MicroRNAs (miRNAs), a class of small non-coding RNAs, have been established as master regulators of a variety of cellular processes that play a key role in tumor initiation, progression and metastasis. This, along with their widespread deregulation in many distinct cancers, has triggered enthusiasm for miRNAs as novel therapeutic targets for cancer management, in particular in patients with refractory cancers such as those harboring KRAS mutations. In this study, we performed a loss-of-function screening approach to identify miRNAs whose silencing promotes sensitivity of lung adenocarcinoma (LUAD) cells to cisplatin. Our results showed in particular that antisense oligonucleotides directed against miR-92a-3p, a member of the oncogenic miR-17 ~ 92 cluster, caused the greatest increase in the sensitivity of KRAS-mutated LUAD cells to cisplatin. In addition, we demonstrated that this miRNA finely regulates the apoptotic threshold and the proliferative capacity of various tumor cell lines with distinct genetic alterations. Collectively, these data suggest that targeting miR-92a-3p may serve as an effective strategy to overcome treatment resistance of solid tumors.

Cell Death and Disease (2023)14:603; <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06125-z>

INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide. Lung adenocarcinoma (LUAD) is the most common subtype of lung cancers and accounts for approximately 40% of all cases [1, 2]. The last 20 years have witnessed considerable progresses in the understanding of the pathogenesis of lung cancers including LUAD, with the advent of genomic technologies, the generation of several genetically engineered mouse models of lung cancers, and the construction of large databases characterizing the molecular features of respiratory tumors [3–6]. Altogether, these multidisciplinary approaches have transformed our view of LUAD from histopathological subtypes to precise molecular and genetic entities that can now be resolved at the single-cell level. Indeed, a vast array of genomic and epigenetic alterations has been reported in LUAD, in particular in genes coding for signaling proteins critical for maintaining normal cellular proliferation and survival [6–9]. Consequently, key genetic determinants are now routinely used to inform disease classification, prognostic stratification, and to support treatment decisions. For example, molecularly targeted therapies have remarkably improved treatment for patients whose tumors harbor somatically activated oncogenes such as mutant *EGFR* or translocated *ALK*, *RET* or *ROS* [10]. Nevertheless, most LUADs either lack an identifiable driver oncogene or carry mutations that are not currently clinically actionable such as those affecting *KRAS*, and are therefore still treated with conventional chemotherapy [11–13].

Despite progress in the understanding of the molecular and cellular basis and mechanisms leading to treatment failure, drug resistance continues to be the main limiting factor to achieve cures in patients with advanced cancer. Indeed, resistance of cancer cells is the major cause of tumor recurrence or relapse and affects not only conventional treatments but also targeted and immunological therapies [14, 15]. Treatment failure often results from multiple genetic and epigenetic alterations and the subsequent perturbation of critical gene and protein networks regulating tumor cell fate [16, 17]. Thus, targeting entire oncogenic networks may achieve deeper and prolonged therapeutic response than targeting individual genes or proteins within a pathway.

MicroRNAs (miRNAs), a class of small non-coding RNAs (ncRNAs) acting as negative regulators of genes involved in fundamental cellular pathways, are implicated in virtually all oncogenic processes [18, 19]. Aberrant miRNA expression is a hallmark of cancer and restoring normal miRNA levels in neoplastic cells exerts significant anti-tumor properties. The ability of miRNAs to regulate multiple genes either within a molecular oncogenic pathway or belonging to distinct but interconnected carcinogenic pathways makes them excellent drug candidates for the development of novel anti-cancer therapeutics [20]. Indeed, developing miRNA-based therapeutics is likely to be more comprehensive and efficient than targeting individual genes or proteins, especially as a limited number of miRNAs are usually dysregulated in cancer,

¹University Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, 59000 Lille, France.

²Université Côte d'Azur, CNRS UMR7275, IPMC, FHU-OncoAge, IHU RespiERA, 06560 Valbonne, France. ³These authors contributed equally: Romain Larrue, Sandy Fellah. ⁴These authors jointly supervised this work: Nicolas Pottier, Cynthia Van der Hauwaert. ✉email: cynthia.vanderhauwaert@inserm.fr

Edited by Dr George Calin

Received: 30 March 2023 Revised: 22 August 2023 Accepted: 5 September 2023

Published online: 13 September 2023

compared to the large expression changes characterizing cancer cell transcriptome and proteome [21].

In this study, we performed a functional miRNA screening to analyze the effects of individual miRNA inhibitors on cell viability and sensitivity to cisplatin using a LUAD cell line harboring *KRAS* mutation. Moreover, our results uncovered miR-92a-3p, a member of the miR-17~92 cluster, as an important regulator of the apoptotic process in various cancer cell lines including pancreatic cancer.

RESULTS

Silencing of miR-92a-3p increases sensitivity of lung adenocarcinoma cells to cisplatin

As the most advanced miRNA-based therapeutic strategy relies on miRNA silencing, we designed a loss-of-function approach to uncover miRNAs whose decreased expression is functionally associated with increased sensitivity to cisplatin. For this, we first profiled A549 cells to identify the most highly expressed miRNAs (Supplementary Table 1), which were identified by small RNA seq, and then performed individual knockdown experiments for each of them using 138 LNA (Locked Nucleic Acid)-based anti-miRNAs (Fig. 1A). Indeed, the LUAD cell line A549 harbors *KRAS*G12S point mutation and is widely used as a representative lung cancer cell model with *KRAS* mutation [22]. Our loss-of-function data identified miR-92a-3p as one of the best miRNAs whose knock-down is associated with cisplatin sensitivity (Fig. 1B).

Modulation of miR-92a-3p influences cisplatin-induced apoptosis of A549 cells through BIM targeting

The BH3-only BIM protein, a bona fide target of miR-92a-3p [23], plays a major role in the initial molecular events of the intrinsic apoptotic pathway, in particular in response to anticancer drugs [24]. Indeed, tumoral expression of BIM has been shown to play a critical role in determining the response of cancer cells to not only conventional cytotoxic drugs, but also to a vast array of targeted agents [24]. Therefore, we investigated whether modulation of

miR-92a-3p in LUAD cells influences their sensitivity to cisplatin through the targeting of BIM. For this, we first confirmed that siRNA-mediated silencing of BIM is sufficient to induce cisplatin resistance of LUAD cells. As depicted in Fig. 2A, siRNA-mediated silencing of BIM in A549 cells significantly reduced the cleavage of caspase 3, a reliable marker of cell apoptosis [25]. Then, we showed that modulation of miR-92a-3p inversely affects BIM expression. Indeed, overexpression of miR-92a-3p in A549 cells resulted in a strong decrease of BIM protein expression, whereas its silencing led to the induction of BIM protein expression (Fig. 2B, D). Finally, we performed gain and loss of function experiments to assess the impact of miR-92a-3p modulation on cisplatin-induced cell apoptosis. We showed that overexpression of miR-92a-3p impaired cisplatin cytotoxic effects on A549 cells, whereas its silencing exacerbated cisplatin apoptotic effects (Fig. 2C, E). As miRNAs usually regulate multiple functionally-related RNA targets to exert their function, we also investigated whether inhibiting miR-92a-3p also promotes cisplatin-induced apoptosis in BIM-depleted cells. As depicted in Fig. S1, our results show that the regulation of apoptosis by miR-92a-3p in LUAD cells is not restricted to the targeting of BIM but instead likely involves additional targets.

Altogether, these results suggest that miR-92a-3p influences LUAD cell sensitivity to cisplatin by regulating BIM expression.

Modulation of miR-92a-3p expression affects the proliferation of LUAD cells by targeting PTEN

To further characterize the oncogenic properties of miR-92a-3p, we investigated whether modulation of miR-92a-3p expression also impacts LUAD cell proliferation. To explore this, we first analyzed whether changes in miR-92a-3p expression affects cell growth using the CellTiterGlo cell-based assay. Our results showed that ectopic expression of miR-92a-3p in A549 cells performed three days after transfection led to an increase in cell viability that likely reflects enhanced cell growth, whereas antisense-mediated reduction of miR-92a-3p expression had the opposite effect (Fig. 2F, G). To strengthen these findings, we then performed Ki-67

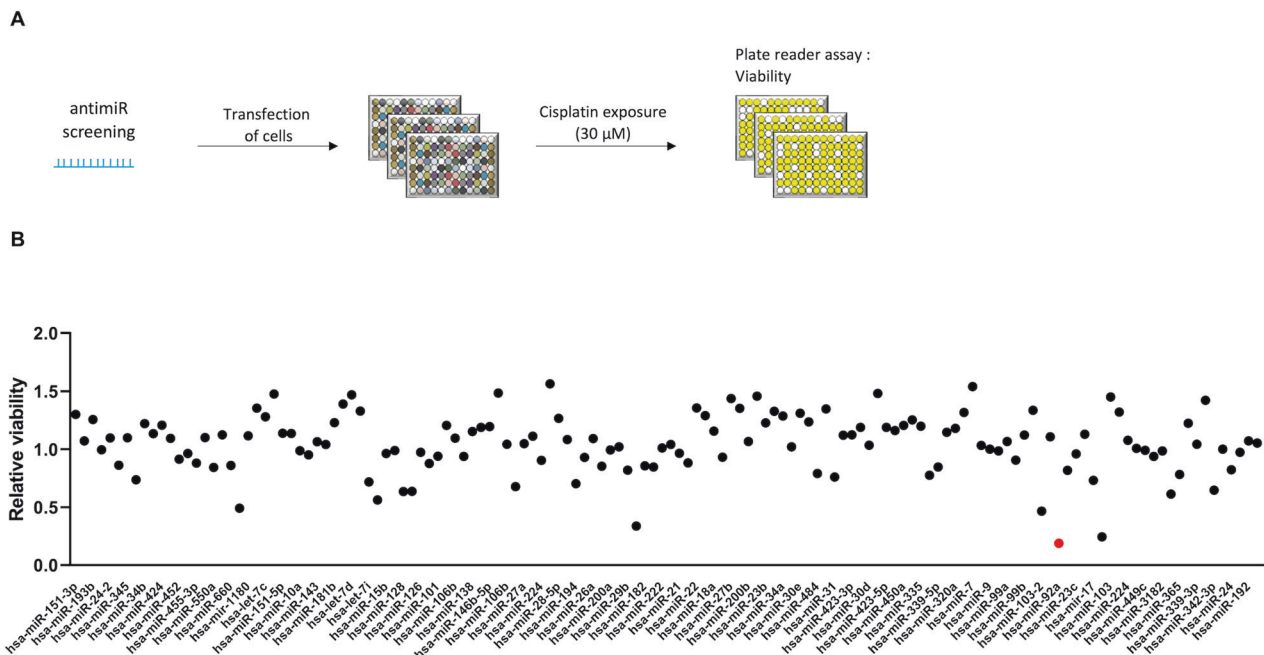


Fig. 1 MiRNA loss-of-function screening reveals miR-92a-3p as a determinant of lung adenocarcinoma cell sensitivity to cisplatin. **A** Library of LNA-based miRNA inhibitors against the most expressed miRNAs in A549 was transfected in A549 cell line. Cells were then exposed to cisplatin at 30 μ M for 72 h. Viability was measured using the CellTiterGlo assay. **B** miR-92a-3p (red dot) is the miRNA whose down-regulation is the most associated with cell death after cisplatin exposure at the indicated concentration. $n = 2$ independent experiments; *** $p < 0.001$.

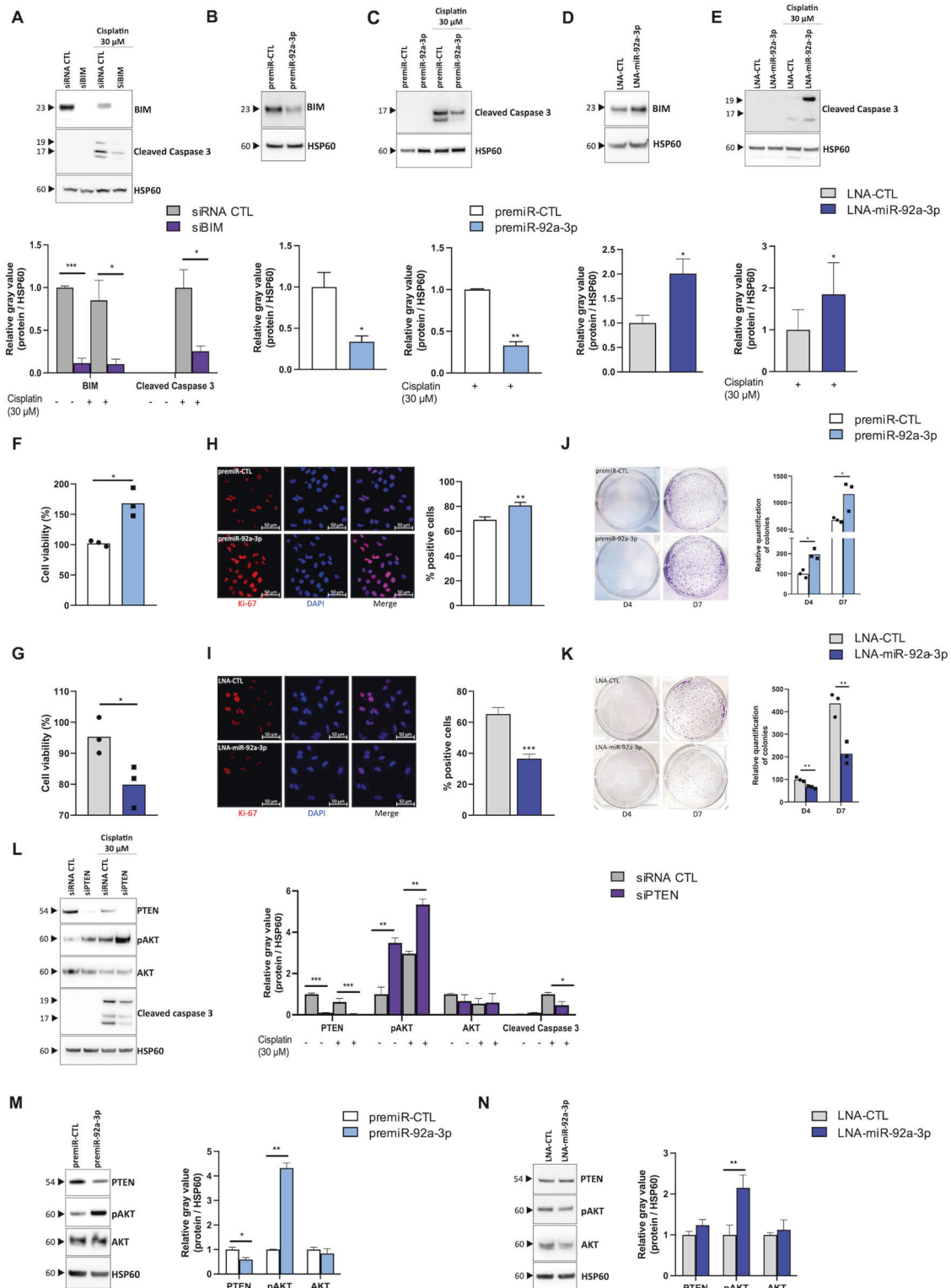


Fig. 2 Modulation of miR-92a-3p influences the oncogenic properties of KRAS-mutated LUAD cells by targeting BIM and PTEN. **A** Western blot showing the effect of BIM inhibition on the caspase 3 apoptotic response induced by cisplatin (30 μ M for 24 h). **B–E** Western blots showing the effect of (**B**, **D**) the modulation of miR-92a-3p on BIM expression and (**C**, **E**) on the caspase 3 apoptotic response induced by cisplatin (30 μ M for 24 h). **F**, **G** Proliferation measured by cell viability 3 days after transfection of cells with (**F**) a premiR negative control and a premiR-92a-3p or (**G**) a LNA negative control and a LNA-miR-92a-3p. **H**, **I** Immunofluorescence showing the effect of (**H**) miR-92a-3p overexpression or (**I**) inhibition on Ki-67 expression. Quantitative data were obtained by measuring co-localization of DAPI staining with Ki-67 positive areas using ImageJ software. Data are presented as the mean \pm SEM. **J**, **K** Colony formation assay stained with crystal violet in cells transfected (**J**) with a premiR negative control and a premiR-92a-3p or (**K**) with a LNA negative control and a LNA-miR-92a-3p 4 and 7 days following transfection. **L** Western blot showing the effect of PTEN inhibition on the PTEN/AKT axis and on the caspase 3 apoptotic response induced by cisplatin (30 μ M for 24 h). **M**, **N** Western blots showing the effect of the modulation of miR-92a-3p on the PTEN/AKT axis. Data are shown as mean \pm SEM. $n = 3$ independent experiments. Representative Western blots are shown along with their quantification. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CTL control, LNA Locked Nucleic Acid.

staining, a reliable method for evaluating cell proliferation, using A549 cells in which miR-92a-3p is either silenced or over-expressed. As shown in Fig. 2H, I, transfection of miR-92a-3p mimics increased the number of proliferating cells compared to control cells, whereas its knockdown negatively influenced cell growth. To determine the effect of miR-92a-3p on tumor-initiating capacity, a clonogenic assay was also performed. This showed that mimic miR-92a-3p-transfected A549 cells gave rise to significantly more colonies than control cells at the indicated time points following transfection (Fig. 2J). Conversely, silencing of miR-92a-3p expression resulted in a reduced number of colonies (Fig. 2K). Finally, as miR-92a-3p has been previously reported to directly target PTEN, the main regulator of the pro-proliferative and survival PI3K/AKT signaling pathway [26, 27], we evaluated whether miR-92a-3p also influences the PTEN/AKT axis in LUAD (Fig. 2L–N). As shown in Fig. 2M, overexpression of miR-92a-3p was sufficient to reduce PTEN expression and to increase phosphorylation of AKT, whereas silencing of miR-92a-3p decreased pAKT expression (Fig. 2N). Overall, these results demonstrate that miR-92a-3p contributes to the malignant phenotype of LUAD by regulating cell proliferation.

MiR-92a-3p also modulates the sensitivity of other LUAD cell lines with distinct molecular alterations to cisplatin

To evaluate the importance of targeting miR-92a-3p in LUAD, we performed additional experiments using two other LUAD cell lines exhibiting distinct mutational profiles (PC9 and H1975, which harbor TP53 and EGFR mutations). Figure 3A–D showed that similarly, inhibition of miR-92a-3p increased BIM expression and the cleavage of caspase 3 following cisplatin treatment. Moreover, transfection with miR-92a-3p mimic increased cell growth and Ki-67 positive cells whereas transfection with miR-92a-3p inhibitor decreased cell proliferation in both cell lines (Fig. 3E–L). Altogether, these results suggest that miR-92a-3p influences LUAD cell sensitivity to cisplatin and proliferation independently of their mutational status.

Concomitant altered pulmonary expression of both BIM and miR-92a-3p in the KRASG12D-mediated lung cancer mouse model

To further strengthen our *in vitro* findings, expression levels of miR-92a-3p and BIM were assessed in the KRASG12D-mediated lung adenocarcinoma mouse model, which closely resembles the genetic and pathophysiological features of human lung adenocarcinoma. Compared with control, these analyses showed an increased expression of miR-92a-3p in tumor tissue, 15 weeks after tumor induction, along with a reduced tumoral BIM protein expression compared to adjacent non-tumor tissue (Fig. 4).

miR-92a-3p also influences response of pancreatic cancer cells to cisplatin

As mutation of *KRAS* is the most frequent genetic alteration in pancreatic adenocarcinoma as well as in precancerous lesions such as PanIN (Pancreatic Intraepithelial neoplasia) [28], we evaluated whether miR-92a-3p also influences response of *KRAS*-mutated pancreatic cancer cells to cisplatin by performing loss of function experiments in PANC1 cells, a human epithelioid carcinoma cell line harboring the KRASG12D mutation. This showed that downregulation of miR-92a-3p led to the induction of BIM expression and to the increase of caspase 3 cleavage after cisplatin exposure (Fig. 5A, B). Moreover, silencing of miR-92a-3p decreased PANC1 cell proliferation as shown in Fig. 5C.

Expression of miR-92a-3p was also assessed in tumoral tissues from the KRASG12D-mediated pancreatic cancer mouse model and compared with corresponding wild-type animals (Fig. 5D). Figure 5E indicates that mice exhibiting PanIN lesions or invasive pancreatic ductal adenocarcinoma show an increased miR-92a-3p expression and a downregulation of BIM expression.

Targeting the polycistronic lncRNA MIR17HG has no effect on the sensitivity of LUAD cells to cisplatin

As miR-92a-3p belongs to the polycistronic miRNA cluster miR-17~92 encoded by MIR17HG, which gives rise to six oncogenic miRNAs grouped into four different families (miR-17, miR-18, miR-19, and miR-92) based on their seed regions [29], we reasoned that directly targeting nuclear MIR17HG would provide a much more efficient approach to promote cisplatin sensitivity by simultaneously inducing the downregulation of all members of the miR-17~92 cluster. Interestingly, this strategy was recently successfully applied in multiple myeloma using GapmeRs, which consist of single-stranded antisense oligonucleotides able to induce RNase-H cleavage of the targeted transcript especially in the nucleus [30]. We first confirmed the nuclear localization of MIR17HG by RNA-Fish® in A549 cells and its increased expression in the LUAD mouse model (Fig. S2A–B).

We then designed ten distinct GapmeRs directed against human MIR17HG and tested their efficacy *in vitro* using A549 and PC9 cell lines. As shown in Fig. S2C, among the ten tested GapmeRs, eight were able to efficiently repress nuclear MIR17HG 48 h after transfection. Nevertheless, two of them exhibited strong cellular toxicity likely due to off-target effects and were thus excluded. We then assessed whether the six selected GapmeRs significantly alter the expression level of the miRNAs including in the miR-17~92 cluster. As depicted in Fig. S2C, each of the six selected GapmeRs reproducibly but modestly induced the downregulation of all members of the cluster 72 h after transfection in A549 cells (Fig. S2C) and in PC9 cells (data not shown). However, in contrast to the study from Morelli et al. [31], none of the selected GapmeRs was able to affect BIM expression or cisplatin sensitivity (Fig. S2D).

DISCUSSION

Cancer therapy usually relies on the simultaneous or sequential administration of chemotherapeutic agents with non-overlapping mechanisms of action to achieve greater treatment efficacy and to prevent the selection of drug resistant clones as well as the subsequent early regrowth of tumors [32, 33]. Nevertheless, despite remarkable successes in some forms of lymphoma, breast and testicular cancers, most patients receiving polychemotherapy inevitably relapse [34]. Therefore, new insights into the molecular determinants of tumor sensitivity to chemotherapy are critical to optimize current treatment regimens and to develop new effective combination therapies. This is particularly true for mutant *KRAS*-driven lung tumors, which are usually refractory to first-line platinum-based chemotherapy [35]. In this study, we reasoned that miRNA-based combination therapy represents an attractive therapeutic strategy to increase cisplatin response of *KRAS*-driven lung cancer. Indeed, the ability of miRNAs to modulate multiple transcripts from the same or interconnected oncogenic pathways represents a steady advantage over traditional single gene approaches [36].

Functional genetic screening is a powerful unbiased strategy for assessing the role of specific genes in different neoplastic phenotypes, and the rapid identification of novel drug targets [37, 38]. Indeed, this approach has the great advantage of enabling the establishment of a causative link between gene expression and a specific oncogenic phenotype such as response to anticancer agents, in contrast to many other profiling high-throughput methods that are mainly correlative [37]. In line with this, we designed a miRNA loss-of-function drug sensitization screen to uncover miRNAs whose loss-of-function silencing reduces the viability of *KRAS* mutated A549 cells in the presence of a sublethal concentration of cisplatin. Among the various miRNAs investigated, we focused our attention on miR-92a-3p, whose decreased expression has the greatest impact on cisplatin sensitivity. Indeed, miR-92a-3p is a well-characterized small

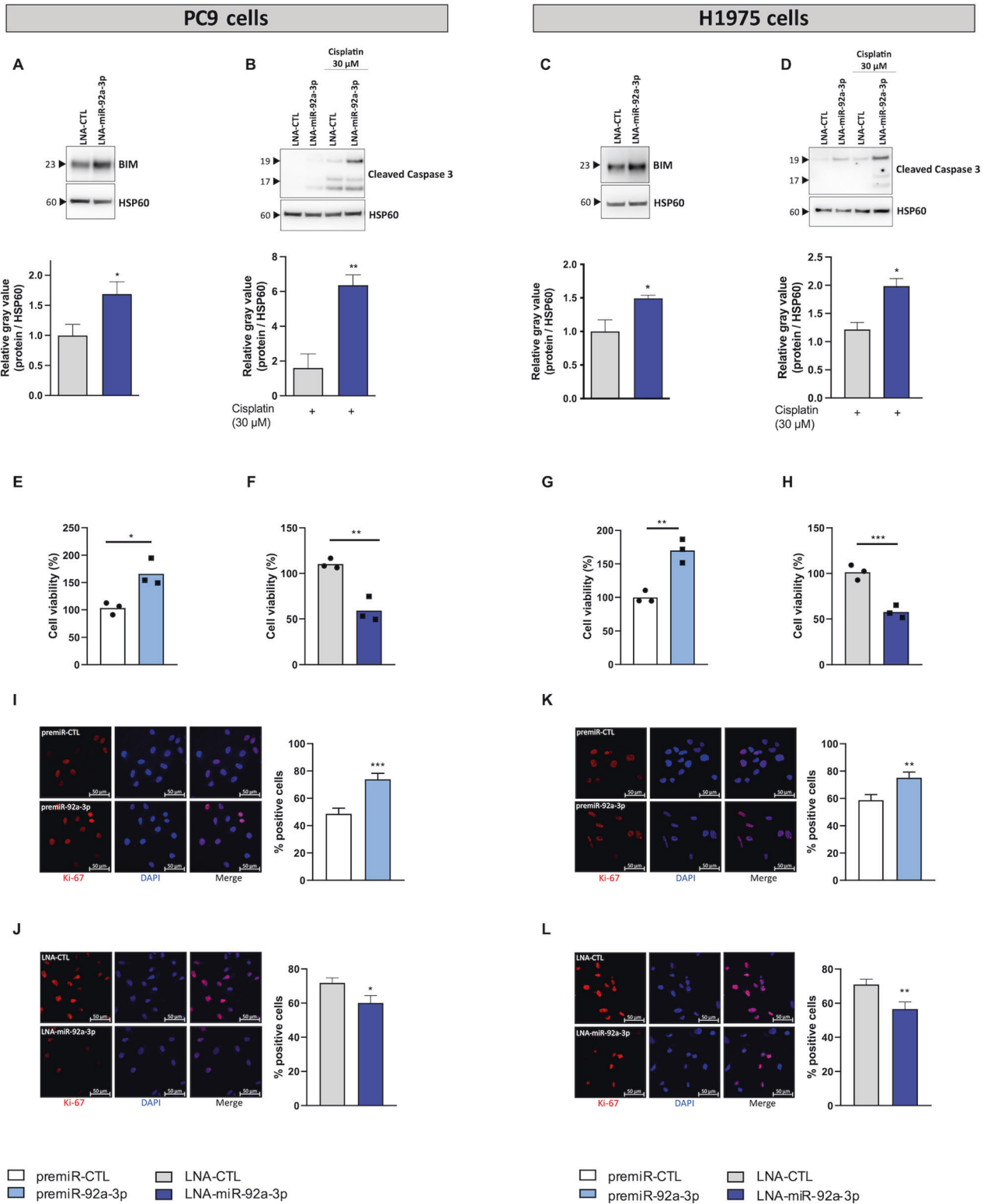


Fig. 3 miR-92a-3p induces apoptosis in PC9 and H1975 cells in response to cisplatin exposure by targeting BIM. **A–D** Western blots showing the effect of the inhibition of miR-92a-3p on (**A, C**) BIM expression and (**B, D**) the caspase 3 apoptotic response induced by cisplatin (30 μM for 24 h) in both cell lines. **E–H** Proliferation measured by cell viability 3 days after transfection in both cell lines with (**E, G**) a premiR negative control and a premiR-92a-3p or with (**F, H**) a LNA negative control and a LNA-miR-92a-3p. **I–L** Immunofluorescence showing the effect of miR-92a-3p (**I, K**) overexpression or (**J, L**) inhibition on Ki-67 expression. Quantitative data were obtained by measuring co-localization of DAPI staining with Ki-67 positive areas using ImageJ software. Data are presented as the mean \pm SEM. $n = 3$ independent experiments. Representative Western blots are shown along with their quantification. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CTL control, LNA Locked Nucleic Acid.

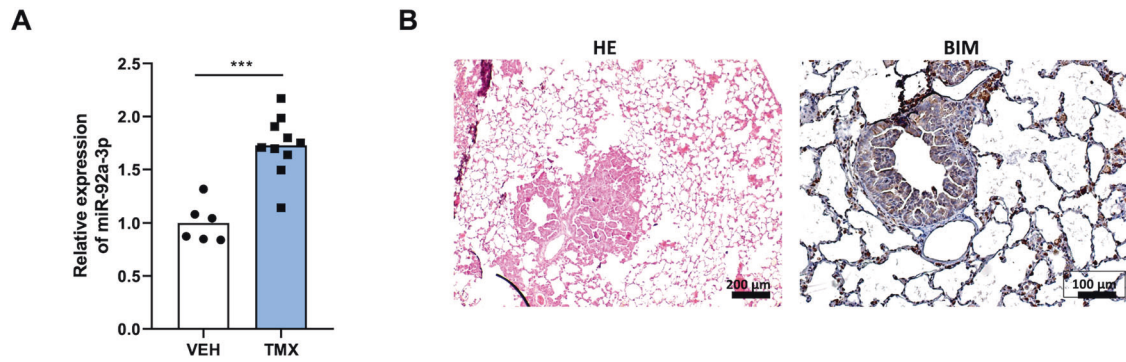


Fig. 4 miR-92a-3p and its target BIM are dysregulated in lung tumors of the experimental KRASG12D-mediated lung cancer mouse model. **A** Relative expression of miR-92a-3p in lung tissues of mice treated with tamoxifen ($n = 10$) or vehicle ($n = 6$). **B** Representative images of lung tissue sections assessed by hematoxylin and eosin staining and immunohistochemical analysis of BIM. *** $p < 0.001$. VEH vehicle, TMX tamoxifen, HE hematoxylin and eosin.

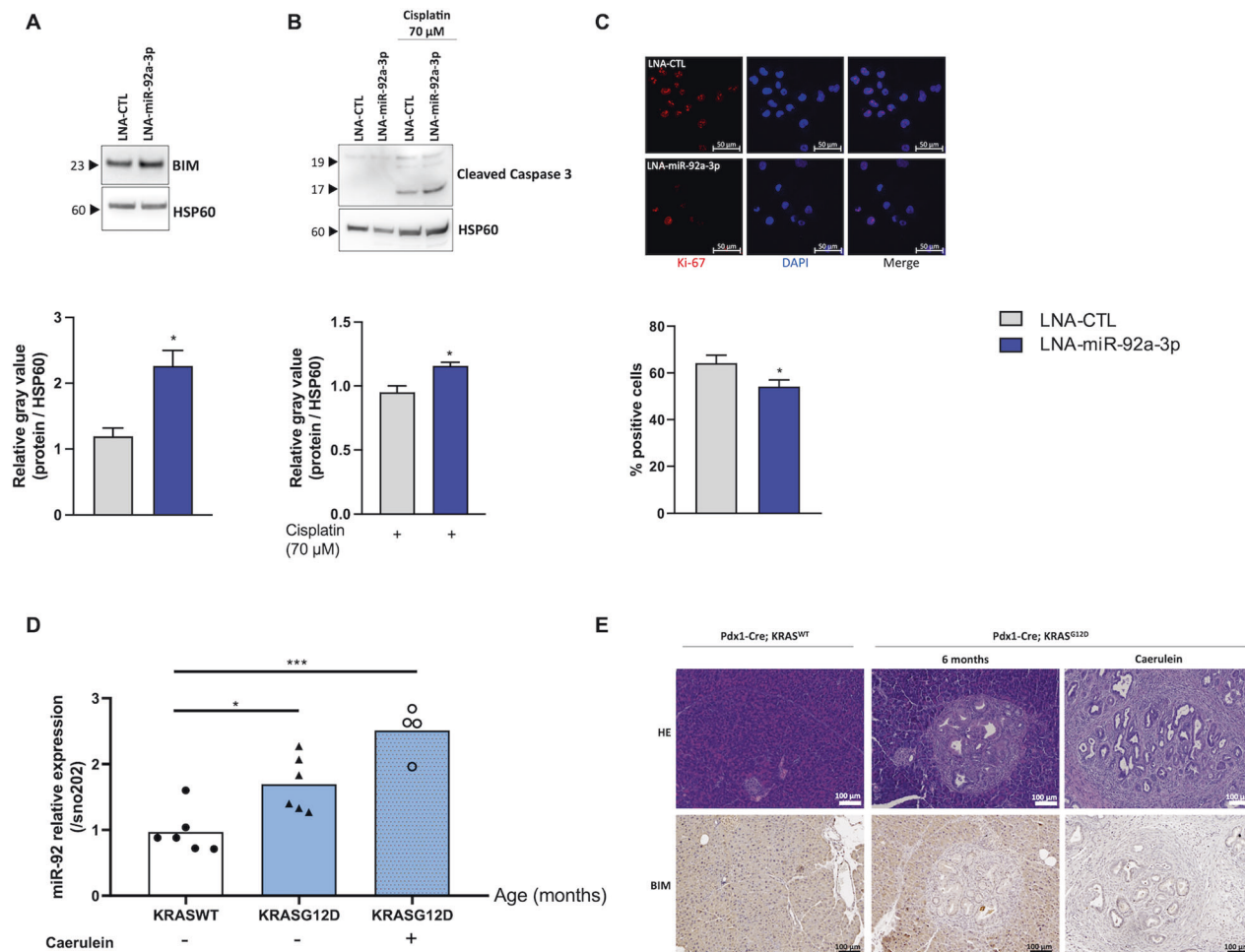


Fig. 5 miR-92a-3p influences response of pancreatic cancer cells to cisplatin. **A, B** Western blot showing the effect of miR-92a-3p inhibition in PANC1 cells on **(A)** BIM expression and **(B)** the caspase 3 apoptotic response induced by cisplatin ($70 \mu\text{M}$ for 24 h). Representative Western blots are shown along with their quantification. **C** Immunofluorescence showing the effect of miR-92a-3p inhibition on Ki-67 expression. Quantitative data were obtained by measuring co-localization of DAPI staining with Ki-67 areas using ImageJ software. Data are presented as the mean \pm SEM. $n = 3$ independent experiments. **D** Relative expression of miR-92a-3p in tumoral tissues from the KRASG12D-mediated pancreatic cancer mouse model with or without caerulein injections and compared with corresponding wild-type mice. **E** Representative images of mouse pancreatic sections stained with hematoxylin and eosin and immunohistochemical analysis of BIM. Data are presented as the mean \pm SEM. $n =$ at least four mice per group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. WT wild type.

oncogenic ncRNA whose pro-tumoral activity has been characterized in a variety of distinct human malignancies [39–41]. In particular, this ncRNA is almost invariably overexpressed in tumors and represents an important regulator of numerous tumorigenic processes including cell proliferation and apoptosis through various molecular mechanisms that can be shared by cancer cells or unique to a given tumor type [42–44]. For example, miR-92a-3p has been shown to inhibit apoptosis and tumor growth in many distinct malignancies by targeting the BH3-only protein BIM and PTEN respectively [23, 27], while promoting cell proliferation by cancer-type specific mechanisms involving targeting of genes such as BTG2 in breast cancer or FBXW7 in renal cancer [39, 45]. In lung cancer, previous reports have notably shown the diagnostic/prognostic value of miR-92a-3p as well as a significant association between expression of this miRNA and response to radiotherapy [46–49]. Nevertheless, although several in vitro evidence support an oncogenic role of miR-92a-3p in lung cancer cells [50], its precise molecular function remains unclear and little is known about the role played by miR-92a-3p in chemoresistance. In this study, we showed that miR-92a-3p, using gain- and loss-of-function approaches, is an important determinant of LUAD sensitivity to cisplatin not only in cells in which *KRAS* is mutated but also in those harboring alteration of *TP53*. This is indeed of particular interest, as *TP53* somatic mutations frequently occur in LUAD patients and are usually associated with resistance to therapy including cisplatin-based treatment regimens [51].

Mechanistically, we showed that miR-92a-3p influences, at least in part, cisplatin sensitivity by fine-tuning the BH3 only protein BIM, a central activator of apoptosis [52]. This is consistent with a previous study that linked loss of expression of BIM with cisplatin resistance in ovarian cancer [52]. Interestingly, we also showed that silencing of miR-92a-3p also increases BIM protein expression and sensitivity to cisplatin in another *KRAS*-driven tumor cell line model distinct from LUAD, the pancreatic ductal adenocarcinoma. As this malignancy is also usually refractory to therapies, our results warrant additional investigations to evaluate whether the targeting of miR-92a-3p could represent a new therapeutic option, especially as cisplatin is not used as first-line treatment in this disease. Finally, our results also showed that modulation of miR-92a-3p expression not only influences apoptosis but also cancer cell proliferation likely by regulating the PTEN/AKT signaling pathway. Thus, miR-92a-3p is involved in the regulation of distinct biological cell processes essential for the initiation and maintenance of the malignant phenotype [53].

As miR-92a-3p belongs to the polycistronic miRNA cluster miR-17~92 encoded by *MIR17HG*, we hypothesized that directly targeting *MIR17HG* using a single GapmeR, would represent a better strategy to promote cisplatin sensitivity by simultaneously inducing the downregulation of the six miRNAs encoded by miR-17~92. Indeed, it is well-established that the oncogenic activity of the cluster primarily relies on its cognate miRNAs that efficiently modulate multiple oncogenic pathways by regulating a repertoire of targets that can be shared by members of this cluster or specific to an individual miRNA. However, in contrast to Morelli et al. (2018) who recently successfully applied this approach in multiple myeloma, none of the GapmeRs tested was able to modulate BIM expression or promote the sensitivity of LUAD to cisplatin [31]. This may be explained by an addiction effect of the GapmeR designed by Morelli et al. (2018) [31]. Therefore, additional works should be performed to better understand these discrepancies.

In conclusion, our results support a fundamental role of miR-92a-3p in the regulation of the apoptotic process which may be therapeutically exploited to promote the sensitivity of cancer cells to cisplatin.

METHODS

Cell culture

Human non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells (ATCC, LGC Standards S.A.R.L, Molsheim, France) and human pancreatic epithelial carcinoma PANC1 cells (ATCC) were cultured in Glutamax-containing DMEM (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) medium supplemented with 10% FBS (ThermoFisher Scientific) and 1% Penicillin/Streptomycin (ThermoFisher Scientific). Human NSCLC PC9 (ATCC) and H1975 (ATCC) cells were cultured in Glutamax-containing RPMI (ThermoFisher Scientific) supplemented as above. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in T75 flasks and seeded into 6-, 24- or 96-well plates 24 h before the experiments.

Functional screening

A library of LNA-based miRNA inhibitors (Qiagen, miRbase version 10, Les Ulis, France) against the most highly expressed miRNAs in A549 cells was used in this study (Supplemental Table 1), which were identified by small RNA seq on SOLID 5500 WF (ThermoFisher Scientific). Each LNA inhibitor (10 nM) was transfected in triplicate in A549 cells using Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) in 96-well plates. After 48 hours, cells were exposed to a sub-apoptotic dose of cisplatin (30 μM for three days). Viability was assessed using the CellTiterGlo assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Normalization was carried out by dividing each sample value by the median of all samples on the plate (the majority of sample wells will thus serve as a reference). miRNA candidates were selected for further analysis based on statistical significance ($p < 0.01$) and degree of sensibility induced (assessed by viability after drug exposure, normalized viability below 3).

Small RNA-Seq

Small RNA-Seq was performed as described in [54]. Briefly, 500 ng of total RNAs were ligated, reverse transcribed and amplified (18 cycles) with the reagents from the NextFlex small RNAseq kit V3 (Bioo scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Amplified libraries were quantified with the Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Les Ulis, France), pooled and size-selected from 140 nt to 170 nt with the LabChip XT DNA 300 Assay Kit (Caliper Lifesciences, Villepinte, France). Libraries were then sequenced on an Illumina Nextseq 500 Mid Flowcell with 75 pb reads for a total of 147 M reads.

Transfection and cisplatin exposure

Cells were transfected at 30 to 40% of confluency in 6-, 24- or 96-well plates, using Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) with pre-miRNAs and control miRNA (ThermoFisher Scientific) or LNA inhibitors and LNA negative control (Qiagen) at a final concentration of 10 nM. Antisense oligonucleotides GapmeRs, directed against *MIR17HG* (Supplementary Table 2; Qiagen) and siRNA directed against BIM or PTEN (ThermoFisher Scientific) were transfected as described above at a final concentration of 25 nM and 10 nM respectively.

Forty-eight hours after transfection, cells were exposed to a sub-apoptotic dose of cisplatin at 30 μM or 70 μM for 24 h for NSCLC cell lines and PANC1 respectively.

Protein extraction and immunoblotting

Cells were lysed in RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) buffer (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) containing protease and phosphatase inhibitors (Roche, Meylan, France). Lysates were quantified using the BCA (Bicinchoninic acid) protein assay kit (ThermoFisher Scientific). Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The membranes were blocked with 5% fat free milk or Bovine Serum Albumin (BSA, in case of phospho protein) in Tris-buffered Saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and subsequently incubated with their respective primary antibodies overnight at 4 °C. After washing with TBS-T, membranes were further incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 45 min, followed by washing with TBS-T. Protein bands were visualized with Amersham ECL substrates (GE Healthcare, Buc, France).

The following antibodies were used: goat anti-HSP60 (sc-1052, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany), rabbit anti-cleaved Caspase 3 (Asp175) (#9661, Cell Signaling Technology, Saint-Cyr-L'École, France), rabbit anti-Bim (#2933, Cell Signaling Technology), rabbit anti-PTEN (#9559, Cell Signaling Technology), rabbit anti-pAKT (#4058, Cell Signaling Technology), rabbit anti-AKT (#9272, Cell Signaling Technology).

Immunofluorescence analysis

Cells were grown on a Round Glass Coverslip Ø 16 mm (ThermoFisher Scientific) placed inside a 24-well plate. Coverslips were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, then cells were permeabilized using 0.1% Triton X-100 (Agilent Technologies, Les Ulis, France) for 10 min and blocked with 3% BSA in TBS for 30 min. Incubation with primary antibody rabbit anti-Ki-67 (#9129, Cell Signaling Technology) was performed in a blocking solution BSA (1%) at 37 °C for 1 h. After three washes with TBS, cells were incubated with secondary antibodies for 45 min at 37 °C. Coverslips were then fixed on microscope slides using ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (ThermoFisher Scientific). Fluorescence was detected with a Spinning Disk confocal microscope (Zeiss, Rueil Malmaison, France). Quantitative data were obtained by measuring co-localization of DAPI staining with Ki-67 areas using ImageJ software (National Institute of Health).

Cell proliferation

Cells were grown in 6-well plates and then transfected. After 24 h, cells were seeded into 96-well plates. Cell proliferation was evaluated after three days using the CellTiterGlo kit (Promega).

Clonogenicity

Cells were grown in 6-well plates and then transfected. After 24 h, 4000 cells were seeded into 6-well plates for four and seven days. Cells were fixed with cold methanol and stained with 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich). Excess stain was removed by washing repeatedly with water. For colony quantification, the crystal violet staining was solubilized using 10% acetic acid and the absorbance was measured at a wavelength of 590 nm.

RNA Fish

Custom Stellaris® FISH Probes were designed against MIR17HG using the Stellaris® RNA FISH Probe Designer (Biosearch Technologies, Hoddesdon, United-Kingdom) available online at <https://www.biosearchtech.com>.

A549 cells were grown in µ-Dish 35 mm glass bottom (Ibidi, Nanterre, France). After 48 h of culture, cells were permeabilized using 70% ethanol and then hybridized with the MIR17HG Stellaris RNA FISH Probe set labeled with CAL Fluor Red 590 (Biosearch Technologies), following the manufacturer's instructions at the final concentration of 500 nM. Acquisition was performed using an inverted confocal microscope LSM 710 (Zeiss) with the high-resolution module AiryScan (Zeiss) and a 63x/1.4 oil immersion lens. Images were processed using Zen software (Zeiss).

Mouse models of cancer

All animal care and experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Lille University (Protocol Number: APAFIS#17098.05 and APAFIS#00422.02). Sample size was chosen empirically based on our previous experiences in the calculation of experimental variability; no statistical method was used to predetermine sample size and no samples, mice or data points were excluded from the reported analyses. Experiments were performed non-blinded using treatment group randomized mice. Manipulators carried out all experimental protocols under strict guidelines to ensure careful and consistent handling of the mice.

CCSP-Cre; LSL-KRAS^{G12D} lung adenocarcinoma mouse model. CCSP-Cre and LSL-KRAS^{G12D} mice were purchased from Jackson laboratory (L'Arbresle, France). To induce lung tumors, tamoxifen (0.25 mg/g) (Sigma Aldrich) was injected in CCSP-Cre; LSL-KRAS^{G12D} mice (8 to 12 weeks old males) for 5 days. Fifteen weeks after tumor initiation, mice were sacrificed by cervical dislocation. For histological analysis, lungs were perfused with 10% formalin (Sigma-Aldrich) and then included in paraffin. For molecular biology analysis, lungs were stored in RNAlater solution (ThermoFisher Scientific).

Pdx1-Cre; LSL-KRASG12D pancreatic cancer mouse model. Pdx1-Cre; LSL-KRASG12D mice were a generous gift from Dr Nicolas Jonckheere (UMR9020 CNRS – U1277 Inserm).

To induce pancreatic tumors, intraperitoneal injections of 37.5 µg/mL caerulein (Sigma-Aldrich) solution were performed using 6-month-old transgenic mice following a two-step protocol. First, an acute treatment consisting of an injection every hour for 6 h (1st day) followed by a chronic treatment consisting of caerulein injections 5 days a week for 59 days. After sacrifice, pancreas were collected from 6-month-old KRASG12D males

and WT control mice, fixed and embedded in paraffin for histological analysis or flash-frozen for RNA extraction.

RNA extraction

Total RNAs were extracted from tissue or cell samples with the miRNeasy Mini kit (Qiagen), according to the supplier's recommendations.

Quantitative RT-PCR

For cell samples, miRNA retro-transcription was performed using RT miRCURY LNA kit (Qiagen). Quantitative PCR was performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) with miRCURY LNA Probe PCR kit (Qiagen) and with the following primers: miR-17-5p (YP02119304), miR-18a-5p (YP00204207), miR-19a-3p (YP00205862), miR-19b-3p (YP00204450), miR-20a-5p (YP00204292), miR-92a-3p (YP00204258). For normalization, transcript levels of RNU44 (YP00203902) were used as endogenous control for miRNA expression. For mouse samples, miRNA retro-transcription was performed using the TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific). Quantitative PCR was performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System using Universal Master Mix (ThermoFisher Scientific) and the following TaqMan assays: miR-92a-3p (assay ID 000430), snoRNA202 (assay ID 001232) and snoRNA251 (assay ID 001236).

mRNA retro-transcription was performed using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (ThermoFisher Scientific). Expression levels of genes (primers are listed in Supplementary Table 3) were performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) with Fast SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific). For normalization, transcript levels of PPIA were used as endogenous control for gene expression.

Relative expression levels of mRNAs and miRNAs were assessed using the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) [55].

Histology

5-µm paraffin-embedded sections were mounted and stained with hematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich). Acquisition was performed using a DMI8 microscope (Leica, Nanterre, France) at 20x magnification.

Immunohistochemistry

5-µm paraffin-embedded sections were sequentially incubated in xylene (5 min twice), 100% ethyl alcohol (5 min twice), 95% ethyl alcohol (5 min twice), and 80% ethyl alcohol (5 min). After washing with water, the sections were antigen-retrieved using citrate buffer (pH 6.0; DAKO, Les Ulis, France) in a domestic microwave oven for 20 min and cooled to ambient temperature. Sections were then washed with TBS-T and quenched with 3% hydrogen peroxide in TBS for 10 min, blocked for avidin/biotin activity, blocked with serum-free blocking reagent, and incubated with primary antibody rabbit anti BIM (#C34C5, Cell Signaling Technology). Immunohistochemical staining was developed using the DAB (3,3'-Diaminobenzidine) substrate system (DAKO). Acquisition was performed using a DMI8 microscope (Leica) at 20x magnification.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Results are given as mean ± SEM. Two-tailed Mann-Whitney test was used for single comparisons; one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons. *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

DATA AVAILABILITY

All data generated or analyzed during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

- Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5:288–300.
- Schulze AB, Evers G, Kerkhoff A, Mohr M, Schliemann C, Berdel WE, et al. Future options of molecular-targeted therapy in small cell lung cancer. *Cancers.* 2019;11:690.
- Dutt A, Wong KK. Mouse models of lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006;12:4396s–402s.

4. Ocak S, Sos ML, Thomas RK, Massion PP. High-throughput molecular analysis in lung cancer: insights into biology and potential clinical applications. *Eur Respir J*. 2009;34:489–506.
5. Kwon MC, Berns A. Mouse models for lung cancer. *Mol Oncol*. 2013;7:165–77.
6. Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer Amst Neth*. 2013;82:179–89.
7. Shim HS, Choi YL, Kim L, Chang S, Kim WS, Roh MS, et al. Molecular testing of lung cancers. *J Pathol Transl Med*. 2017;51:242–54.
8. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553:446–54.
9. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EV. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;157:103194.
10. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu YL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet Lond Engl*. 2017;389:299–311.
11. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856:189–210.
12. Kato S, Fujiwara Y, Hong DS. Targeting KRAS: crossroads of signaling and immune inhibition. *J Immunother Precis Oncol*. 2022;5:68–78.
13. Seguin L, Durandy M, Feral CC. Lung adenocarcinoma tumor origin: a guide for personalized medicine. *Cancers*. 2022;14:1759.
14. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res*. 2016;106:27–36.
15. Lin JJ, Shaw AT. Resisting resistance: targeted therapies in lung cancer. *Trends Cancer*. 2016;2:350–64.
16. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1257.
17. Liu WJ, Du Y, Wen R, Yang M, Xu J. Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Pharmacol Ther*. 2020;206:107438.
18. Landau DA, Slack FJ. MicroRNAs in mutagenesis, genomic instability, and DNA repair. *Semin Oncol*. 2011;38:743–51.
19. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004.
20. Reda El Sayed S, Cristante J, Guyon L, Denis J, Chabre O, Cherradi N. MicroRNA therapeutics in cancer: current advances and challenges. *Cancers*. 2021;13:2680.
21. Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. MicroRNA therapeutics: discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res*. 2016;7:68–74.
22. Leung ELH, Luo LX, Liu ZQ, Wong VKW, Lu LL, Xie Y, et al. Inhibition of KRAS-dependent lung cancer cell growth by deltarasin: blockage of autophagy increases its cytotoxicity. *Cell Death Dis*. 2018;9:1–15.
23. Niu H, Wang K, Zhang A, Yang S, Song Z, Wang W, et al. miR-92a is a critical regulator of the apoptosis pathway in glioblastoma with inverse expression of BCL2L11. *Oncol Rep*. 2012;28:1771–7.
24. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in health and disease. *Oncotarget*. 2015;6:23058–134.
25. Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting cleaved caspase-3 in apoptotic cells by flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016.
26. Yu JSL, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*. 2016;143:3050–60.
27. Lu C, Shan Z, Hong J, Yang L. MicroRNA-92a promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in non-small cell lung cancer metastasis. *Int J Oncol*. 2017;51:235–44.
28. Waters AM, Der CJ. KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8:a031435.
29. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*. 2004;64:3087–95.
30. Amodio N, Stamato MA, Juli G, Morelli E, Fulcinitti M, Manzoni M, et al. Drugging the lncRNA MALAT1 via LNA gapmeR ASO inhibits gene expression of proteasome subunits and triggers anti-multiple myeloma activity. *Leukemia*. 2018;32:1948–57.
31. Morelli E, Biamonte L, Federico C, Amodio N, Di Martino MT, Gallo, et al. Therapeutic vulnerability of multiple myeloma to MIR17PT1, a first-in-class inhibitor of pri-miR-17-92. *Blood*. 2018;132:1050–63.
32. Pritchard JR, Lauffenburger DA, Hemann MT. Understanding resistance to combination chemotherapy. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. 2012;15:249–57.
33. Yap TA, Parkes EE, Peng W, Moyers JT, Curran MA, Tawbi HA. Development of immunotherapy combination strategies in cancer. *Cancer Discov*. 2021;11:1368–97.
34. Chatterjee N, Bivona TG. Polytherapy and Targeted Cancer Drug Resistance. *Trends Cancer*. 2019;5:170–82.
35. Xie M, Xu X, Fan Y. KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: An Emerging Promisingly Treatable Subgroup. *Front Oncol*. 2021;11:672612.
36. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9:775–89.
37. Iorns E, Lord CJ, Turner N, Ashworth A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:556–68.
38. Haley B, Roudnicki F. Functional genomics for cancer drug target discovery. *Cancer Cell*. 2020;38:31–43.
39. Jinghua H, Qinghua Z, Chenchen C, Lili C, Xiao X, Yunfei W, et al. MicroRNA miR-92a-3p regulates breast cancer cell proliferation and metastasis via regulating B-cell translocation gene 2 (BTG2). *Bioengineered*. 2021;12:2033–44.
40. Wang Y, Chen A, Zheng C, Zhao L. miR-92a promotes cervical cancer cell proliferation, invasion, and migration by directly targeting PIK3R1. *J Clin Lab Anal*. 2021;35:e23893.
41. Yang J, Hai J, Dong X, Zhang M, Duan S. MicroRNA-92a-3p enhances cisplatin resistance by regulating Krüppel-Like factor 4-mediated cell apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition in cervical cancer. *Front Pharmacol*. 2021;12:783213.
42. Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42:1348–54.
43. Zhang X, Li Y, Qi P, Ma Z. Biology of miR-17-92 cluster and its progress in lung cancer. *Int J Med Sci*. 2018;15:1443–8.
44. Zhao W, Gupta A, Krawczyk J, Gupta S. The miR-17-92 cluster: Yin and Yang in human cancers. *Cancer Treat Res Commun*. 2022;33:100647.
45. Zeng R, Huang J, Sun Y, Luo J. Cell proliferation is induced in renal cell carcinoma through miR-92a-3p upregulation by targeting FBXW7. *Oncol Lett*. 2020;19:3258–68.
46. Huang YF, Liu MW, Xia HB, He R. Expression of miR-92a is associated with the prognosis in non-small cell lung cancer: an observation study. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101:e30970.
47. Reis PP, Drigo SA, Carvalho RF, Lopez Lapa RM, Felix TF, Patel D, et al. Circulating miR-16-5p, miR-92a-3p, and miR-451a in plasma from lung cancer patients: potential application in early detection and a regulatory role in tumorigenesis pathways. *Cancers*. 2020;12:2071.
48. Vykoukal J, Fahrman JF, Patel N, Shimizu M, Ostrin EJ, Dennison JB, et al. Contributions of circulating microRNAs for early detection of lung cancer. *Cancers*. 2022;14:4221.
49. Zeng L, Zeng G, Ye Z. Bioinformatics analysis for identifying differentially expressed MicroRNAs derived from plasma exosomes associated with radiotherapy resistance in non-small-cell lung cancer. *Appl Bionics Biomech*. 2022;2022:9268206.
50. Alcantara KMM, Garcia RL. MicroRNA-92a promotes cell proliferation, migration and survival by directly targeting the tumor suppressor gene NF2 in colorectal and lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2019;41:2103–16.
51. Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *BioMed Res Int*. 2011;2011:e583929.
52. Wang J, Zhou JY, Wu GS. Bim protein degradation contributes to cisplatin resistance. *J Biol Chem*. 2011;286:22384–92.
53. Taieb J, Prager GW, Melisi D, Westphalen CB, D'Esquermes N, Ferreras A, et al. First-line and second-line treatment of patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma in routine clinical practice across Europe: a retrospective, observational chart review study. *ESMO Open*. 2020;5:e000587.
54. Savary G, Dewaeles E, Diazi S, Buscot M, Nottet N, Fassy J, et al. The long noncoding RNA DNM3OS is a reservoir of FibromiRs with major functions in lung fibroblast response to TGF- β and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200:184–98.
55. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001;25:402–8.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Plateformes Lilloises en Biologie et Santé (PLBS) – UMS 2014 – US 41 (Sophie Crespin): the animal care facility (PLBS UAR 2014 - US 41); the Bioluminescence Center Lille (Meryem Tardivel and Antonino Bongiovanni), Edmone Dewaeles and Nicolas Jonckheere for their technical assistance. This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer - Comité Septentrion and by the Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015-2020 (to CC, NP and MP). The Canther Laboratory is part of the ONCOLille Institute.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC, NP conceptualized the study. CVDH, NP, CC designed the methodology. RL, SF, NB, CDS, JL, CL, MG, CVDH performed the experiments. RL, SF, NB, CL, BM, MP, CC, NP, CVDH performed data analysis. CVDH, CC, NP wrote the manuscript. All Authors read and approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06125-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Cynthia Van der Hauwaert.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

