THÈSE

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Lille 2 Droit et Santé
École doctorale biologie – santé

Discipline : physiologie, physiopathologie, biologie systémique médicale
Spécialité : biologie des organismes

Rôle de miR-21 au cours de la réponse rénale à une agression

Marie-Flore Hennino

Soutenue le 28/04/2017

Sous la direction de : M. le Pr François Glowacki
Mme le Dr Christelle Cauffiez

Jury : Mme le Pr Maryvonne Hourmant
M. le Pr Christian Noël
M. le Pr Christophe Mariat (rapporteur)
M. le Dr Bernard Mari (rapporteur)

Rôle de miR-21 au cours de la réponse rénale à une agression

Résumé :

Toute maladie rénale chronique (MRC) se caractérise par le développement de lésions de fibrose rénale et d'une perte de fonction qui peut, à terme conduire vers l'insuffisance rénale chronique terminale. miR-21 est un microARN ubiquitaire impliqué dans le processus de fibrose, notamment rénale. Toutefois, des données expérimentales contradictoires suggèrent que miR-21 pourrait jouer un rôle ambivalent dans la constitution des lésions rénales de fibrose.

L'objectif de ce travail est de préciser l'implication de miR-21 au cours des lésions rénales chroniques chez l'Homme au cours de la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA (maladie de Berger), ou aigües, en s'appuyant sur un modèle murin de toxicité rénale du cisplatine.

Dans un premier travail, une cohorte rétrospective de patients porteurs d'une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA a été caractérisée de façon systématique sur le plan clinico-biologique et anatomo-pathologique (classification d'Oxford). L'expression rénale de trois « fibromiR » (miR-21-5p, miR-199a-5p et miR-214-3p) est associée aux lésions de fibrose rénale ($p \leq 0,02$). Parmi ces microARN, miR-21-5p semble le plus pertinent car il présente des amplitudes de variation d'expression tissulaire rénale plus importantes selon le niveau de fibrose, il est également associé aux lésions de sclérose glomérulaire ($p = 0,001$) et son niveau d'expression tissulaire rénale est associée à une moins bonne survie rénale.

Un second travail a été mené en utilisant un modèle murin d'insuffisance rénale aiguë secondaire à l'injection intra-péritonéale de cisplatine chez des animaux invalidé pour miR-21. Deux schémas d'injections ont été réalisés afin explorer le rôle de miR-21 au cours de lésions rénales aiguës (injection d'une dose unique de 10mg/kg de cisplatine) ou subaiguës (injections répétées de 7 mg/kg de cisplatine). Les souris ayant reçu une injection unique de cisplatine ne présentent pas de différence significative d'urée sanguine, de marqueurs de souffrance rénale (NGAL, KIM-1), d'inflammation (TNF-α, IL-6) et de stress oxydant (HO-1, NRF2), ni d'activité apoptotique selon leur statut sauvage ou invalidé pour miR-21. Le modèle d'injections répétées de cisplatine a, quant à lui, permis de mettre en évidence des lésions plus importantes chez les souris *miR-21*$^{-/-}$. En effet, les souris *miR-21*$^{-/-}$ cisplatine présentent une urée sanguine plus

élevée et une expression rénale de NGAL plus importante que le souris sauvages cisplatine. Enfin les lésions rénales de nécrose tubulaire aiguë observées sont plus sévères chez les souris *miR-21*$^{-/-}$.

Ainsi ces résultats montrent qu'une forte expression rénale de miR-21 est associée à la fibrose et au pronostic rénal chez des patients porteurs d'une MRC. Dans notre modèle expérimental, les souris déficientes pour miR-21 présentent une sensibilité plus importante au développement de lésions rénales induites par le cisplatine, notamment en cas d'injections répétées. Ces résultats confirment que miR-21 joue probablement un rôle ambivalent au cours des lésions rénales, protecteur à la phase précoce d'une agression rénale aiguë et délétère lorsque le processus se prolonge dans le temps.

Mots clefs : miR-21, rein, fibrose, néphropathie à IgA, nécrose tubulaire aiguë, cisplatine.

Role of miR-21 in the response after a renal damage

Abstract :

Independently of the cause, active Chronic Kidney Disease (CKD) leads to the development of fibrotic lesions, responsible for a loss of renal function and ultimately, end-stage renal failure. MiR-21 is a ubiquitous microRNA involved in the fibrosis process, especially renal fibrosis. However, contradictory experimental data suggest that miR-21 could play an ambivalent role in the regulation of renal fibrosis.

The aim of this work was to investigate the involvement of miR-21 in chronic renal lesions based on human renal samples and in acute lesions by using a murine model of renal toxicity induced by cisplatin.

In a first part of the work, a retrospective cohort of patients with IgA nephropathy has been systematically characterized clinically, biologically and pathologically (according to Oxford classification). The renal expression of three "fibromiRs" (miR-21-5p, miR-199a-5p and miR-214-3p) is associated with renal fibrosis lesions ($p \leq 0.02$). Among these microRNAs, miR-21 appears to be the most relevant as it displayed larger amplitudes of variation in renal tissue, it was also associated with glomerular sclerosis ($p = 0.001$) and its strong expression was associated with lower renal survival.

A second part of the work was carried out on a murine model of acute renal failure secondary to the intraperitoneal injection of cisplatin. Two injections schemes were established to investigate the role of miR-21 in acute renal lesions (injection of a single dose of 10 mg/kg cisplatin) or subacute (repeated injections of 7 mg/kg cisplatin). After a single injection of cisplatin, no significant difference in blood urea, renal (NGAL, KIM-1), inflammation (TNF-α, IL-6) and oxidative stress (HO-1, NRF2) nor apoptotic activity was observed in *miR-21*$^{-/-}$ mice compared to wild-type mice. In a model of repeated injections of cisplatin, we observed more renal lesions in *miR-21*$^{-/-}$ mice. Indeed, *miR-21*$^{-/-}$ mice treated with cisplatin exhibited higher blood urea and an increased renal expression of NGAL compared to wild-type mice.

Thus, these results suggest that renal expression of miR-21 is associated with fibrosis and renal prognosis in patients with a CKD. By contrast, in acute renal injury (cisplatin-induced renal injury), mice deficient for miR-21 exhibit a higher sensitivity when cisplatin was administered several times. These results confirm that miR-21

probably plays an ambivalent role in renal lesions and seems to be protective at an early stage, or deleterious when the process is prolonged over time.

Key Words : miR-21, kidney, fibrosis, IgA nephropathy, acute kidney injury, cisplatin.

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté d'examiner et d'évaluer mes travaux : M. le Professeur Christophe Mariat et M. le Docteur Bernard Mari qui ont accepté d'en être les rapporteurs.

Je remercie Mme la Pr Maryvonne Hourmant d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie particulièrement M. le Pr Christian Noël de m'avoir permis d'obtenir un poste d'assistante au cours duquel j'ai pu bénéficier de temps dédié à mon travail au laboratoire.

Je remercie très sincèrement mes directeurs de thèse Mme le Dr Christelle Cauffiez et M. le Pr Glowacki pour leur aide précieuse, leur investissement, leur disponibilité, leur soutien indéfectible.

Je tiens également à remercier :

- Le Dr Jean Marc Lo Guidice directeur de l'EA4483 (Université Lille 2),

- Les Dr David Buob, Viviane Gnemmi et Nicolas Pottier pour leur aide et leurs conseils,

- Cynthia, Cyrille, Grégoire, Edmone, Brigitte pour leur aide précieuse,

- L'ensemble des membres de l'EA4483,

- Mes collègues de Valenciennes pour m'avoir aidée à me libérer du temps,

- Mes parents, beaux-parents, Simon et Léonard pour leur soutien moral et logistique.

PUBLICATIONS EN LIEN AVEC LES TRAVAUX DE THÈSE

Publications :

- **Hennino MF**, Buob D, Van der Hauwaert C, Gnemmi V, Jomaa Z, Pottier N, Savary G, Drumez E, Noël C, Cauffiez C, Glowacki F. miR-21-5p renal expression is associated with fibrosis and renal survival in patients with IgA nephropathy. Sci Rep. 2016 Jun 6;6:27209
- Van der Hauwaert C, Savary G, Buob D, Leroy D, Aubert S, Flamand V, **Hennino MF**, Perrais M, Lo-Guidice JM, Broly F, Cauffiez C, Glowacki F. Expression profiles of genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models. Toxicol Appl Pharmacol. 2014 Sep 15;279(3):409-18.
- Van der Hauwaert C, Savary G, **Hennino MF**, Pottier N, Glowacki F, Cauffiez C. MicroRNAs in kidney fibrosis. Nephrol Ther. 2015. pii: S1769-7255(15)00108-X.

Communications :

- **Société de néphrologie Octobre 2013** : communication affichée

Intérêt pratique du score d'Oxford dans la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA ? F. Glowacki, J. Zacharie, M.F. Hennino, C. Van Der Hauwaert, V. Gnemmi, C. Cauffiez, C. Noël, M.C. Copin, D. Buob. Néphrologie & Thérapeutique, Volume 9, Issue 5, September 2013, Page 334

- **ERA-EDTA Juin 2014** : communication orale

miR-21 is involved in renal fibrosis in IgA nephropathy.Nephrol. Dial. Transplant. (2014) 29 (suppl 3): iii30-iii31 doi:10.1093/ndt/gfu121

- **Société de néphrologie Octobre 2014** : communication orale sélectionnée au concours des internes

Implication du microARN miR-21 dans la progression de la maladie de Berger. M.F. Hennino, C. Van Der Hauwaert, Z. Jomaa, G. Savary, D. Buob, V. Gnemmi, C. Noel, C. Cauffiez, F. Glowacki**.** Néphrologie & Thérapeutique, Volume 10, Issue 5, September 2014, Page 271

- **Journée André Verbert Septembre 2015** : communication affichée

Implication du microARN miR-21 dans la progression de la maladie de Berger.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES **8**
ABBRÉVIATIONS **10**
INTRODUCTION **12**
I. MicroARN : généralités **12**
1) ARN non codants 12
a. Longs ARN non codants 13
b. ARN non codants circulaires 13
c. Petits ARN non codants 13
2) Biogenèse et régulation des microARN 15
a. Biogenèse des miARN 15
b. Régulation 17
3) Mécanismes d'action des miARN 18
a. Mécanisme intra-cellulaire 18
b. miARN circulants 22
II. miR-21 en physiologie et pathologie rénale **25**
1) Biogenèse et contrôle de l'expression de miR-21 25
a. Localisation et caractéristiques du gène 25
b. Régulation 27
c. Expression de miR-21 en situation physiologique et pathologique 31
2) Implication de miR-21 en physiologie rénale 32
a. Expression rénale de miR-21 32
b. Développement rénal 33
c. Régénération rénale : l'exemple de Nothobranchius Furzeri 33
3) miR-21 au cours d'une agression rénale 34
a. miR-21 en pathologie rénale humaine 34
b. miR-21 dans les modèles animaux de pathologie rénale 34
4) Cibles de miR-21 47
a. Techniques d'analyse des cibles de miR-21 47
b. Cibles de miR-21 50
TRAVAUX PERSONNELS **65**
I. Objectifs des travaux **65**
II. Implication de miR-21 dans la fibrose au cours de la néphropathie à IgA **66**
1) Contexte 66
a. Néphropathie à IgA 66
b. Fibrose rénale 68

c. MicroARN dans la néphropathie à IgA ... 70
d. Objectifs des travaux ... 71
2) Travaux ... 72
a. Communications affichées ... 72
b. Publication ... 72
3) Discussion ... 74
III. Implication de miR-21 au cours de l'insuffisance rénale aiguë : modèle de la toxicité tubulaire du cisplatine ... 75
1) Contexte ... 75
a. Cisplatine ... 75
b. miARN et cisplatine ... 79
2) Rôle de miR-21 dans la néphrotoxicité du cisplatine : travaux non publiés ... 79
c. Matériel et méthodes ... 80
d. Résultats ... 85
3) Discussion ... 93
DISCUSSION ... 96
I. miR-21, un biomarqueur diagnostique et pronostique pertinent ? ... 99
II. Potentiel thérapeutique de miR-21 ... 102
CONCLUSION ... 108
BIBLIOGRAPHIE ... 109
ANNEXES ... 135

ABBRÉVIATIONS

ADAM(-TS) : A Disintegrin And Metalloproteinase (with ThromboSpondin motifs)

AGO : Argonaute

AKI : Acute Kidney Injury

ARNm : ARN messager

AP-1 : Activator Protein 1

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

α-SMA : α - Smooth Muscle Actin

BCL2 : B-Cell Lymphoma-2

ChIP : Chronmatin ImmunoPrecipitation

CTP : Cellule Tubulaire Proximale

DGCR8 : Di George Syndrom Critical Region 8

HDL : High Density Lipoprotein

HIF-1α : Hypoxic Inducible Factor-1

HITS-CLIP : HIgh-Throughput Sequencing of RNAs isolated by CrossLinking ImmunoPrecipitation

HO-1 : Heme Oxygenase-1

IgAN : Néphropathie à IgA

IL : interleukine

IRA : Insuffisance Rénale Aiguë

KIM-1 : Kidney Injury Molecule 1

KO : Knock Out

LNA : Locked Nucleic Acid

lncARN : long ARN non codant

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

miARN / miR : microARN

MKK3 : Mitogen Activated Protein Kinase-Kinase 3

MMP : Matrix Mettalo Protease

MRC : Maladie Rénale Chronique

mTor : mammalian Target of rapamycin

ncARN : ARN non codant

NGAL : Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin

NRF2 : Nuclear Factor Erythroid-Derived-2 like-2

NTA : Nécrose Tubulaire Aiguë

PBS : Phosphate Buffer Saline

PDCD4 : Programmed Cell Death protein 4

PHD2 : Prolyl Hydroxylase Domain

PTEN : Phosphatase and TENsin homologue

piRNA : piwi interacting RNA

RECK : REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

siRNA : small interfering RNA

snoRNA : small nucleolar RNA

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

THSP-1 : thrombospondine-1

TIMP3 : Tissue Inhibitors of MetalloProteinase 3

TNF-α : Tumor Necrosis Factor α

UTR : UnTranslated Region

INTRODUCTION

I. MicroARN : généralités

1) ARN non codants

Le génome humain est composé d'environ 3,4 milliards de paires de base, dont seulement 2% conduisent à la synthèse de protéines. Dans les années 80 (Zaug and Cech 1980) émerge l'idée que des ARN non codants (ncARN) jouent un rôle prépondérant dans différents mécanismes cellulaires, notamment la régulation de l'expression génique et le remodelage de l'ADN (Cech and Steitz 2014). Les premiers ncARN décrits furent les ARN ribosomiques et les ARN de transfert. De nombreux autres ncARN, caractérisés par la longueur du transcrit, leur biogenèse et leur fonction, sont impliqués dans différents processus cellulaires, dont par exemple la régulation de l'expression génique ou du remodelage de l'ADN (Figure 1).

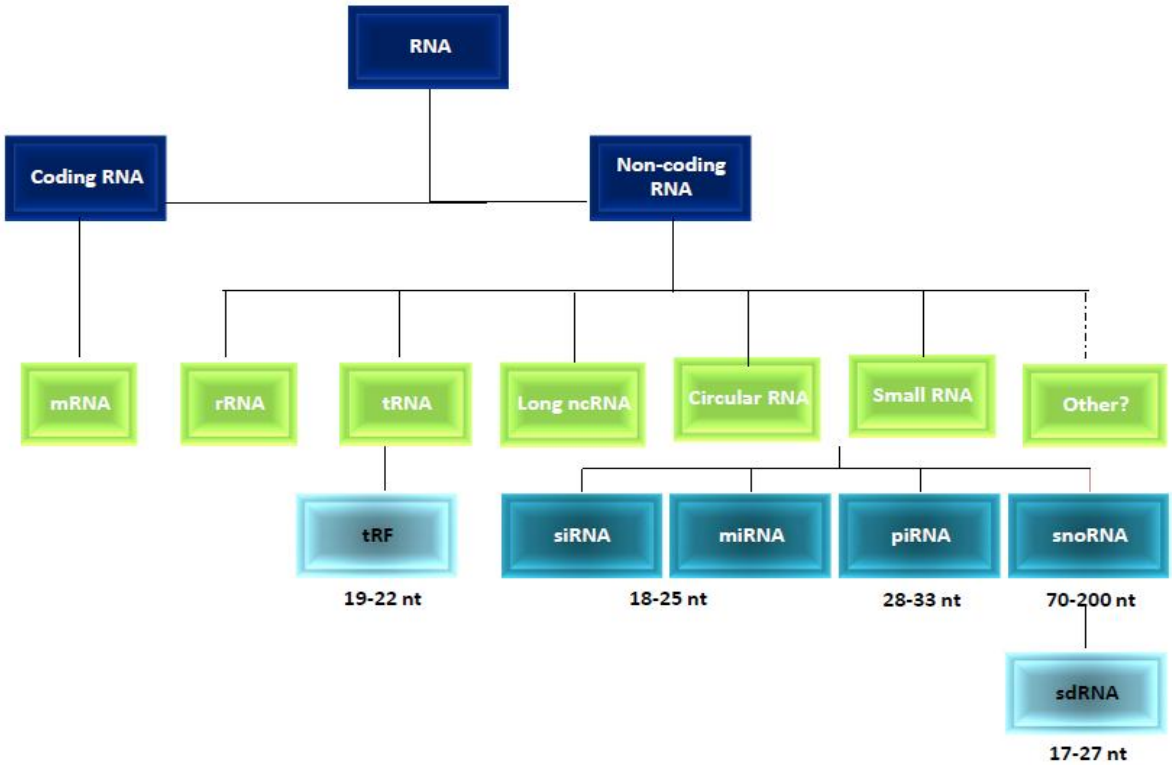


Figure 1 : Classification des ARN. Les ARN non codants sont divisés en sous catégories en fonction de leur taille et de leur nature. rRNA : Ribosomal ARN, tRNA : transfert RNA, tRF : tRNA-derived RNA fragments, siRNA : small interfering RNA, piRNA : piwi interactings RNA, snoRNA : small nucleolar RNA, sdRNA : sno-derived RNA. D'après Cech and Steitz 2014.

a. *Longs ARN non codants*

On distingue ainsi les longs ARN non codants (lncARN) de taille très variable et comprenant plus de 200 nucléotides. Cette classe d'ARN non codants est encore mal caractérisée, mais semble intervenir principalement dans la modulation de l'expression des gènes. Ainsi, les lncRNA peuvent favoriser l'interaction de protéines, guider des complexes protéiques vers leurs gènes cibles, séquestrer des protéines ou des microARN et influencer les processus post-transcriptionnels liés aux ARNm, comme la traduction, l'épissage et la dégradation de l'ARN messager (ARNm) (Mathieu et al. 2014). A titre d'exemple, HOTAIR recrute les complexes PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) (Rinn et al. 2007) et LSD1 (Lysine (K)-Specific Demethylase 1A) (Tsai et al. 2010) afin de réprimer la transcription des gènes *HOXD* (Homeobox D), impliqués dans le développement embryonnaire.

b. *ARN non codants circulaires*

Les ARN circulaires (ARNc) sont caractérisés par une boucle formée par une liaison covalente entre les extrémités 3' et 5' de l'ARN et ont une taille comprise entre 100 et 4000 nucléotides (Abu and Jamal 2016). La plupart des gènes des ARNc sont situés dans des régions exoniques de gènes codants. Certains ARN circulaires agissent comme des régulateurs de la transcription en *cis* (Lasda and Parker 2016), d'autres jouent le rôle d'éponges à microARN (Yonghua Chen et al. 2016).

c. *Petits ARN non codants*

Parmi les petits ncARN (< 200 nucléotides), les microARN (miARN), les small interferring ARN (siARN) et les piwi-interacting ARN (piARN) interagissent avec les différentes protéines argonautes (protéines se liant à de petits ARN non codants) et régulent ainsi la traduction. Il existe des petits ncARN non régulateurs de la traduction, par exemple les small nucleolar ARN (snoARN), guidant des modifications chimiques des ARN ribosomiques dans le nucléole (Matera, Terns, and Terns 2007).

i. *piARN*

Les piARN sont des molécules de 26 à 31 nucléotides caractérisés par une uridine en 5' et une 2'-O-méthylation en 3', permettant probablement d'augmenter la stabilité de

la molécule. Les piARN sont des éléments centraux du développement des lignées germinales, en particulier chez la drosophile (Ghildiyal and Zamore 2009), en ciblant les transposons. Les piARN joueraient également un rôle de « gardiens du génome » dans les cellules germinales grâce à un système de dégradation des séquences mutées indésirables reconnues par complémentarité parmi un vaste répertoire de piARN (Muller, Raman Pandey, and Pillai 2013). Leur rôle en dehors du développement reste l'objet de débat.

ii. siARN endogènes

Ces petits ARN de 21 nucléotides (orientation sens ou anti-sens) ont une extrémité 3' modifiée et, contrairement aux miARN et aux piARN, ne présentent pas nécessairement un uracil en début de séquence. Ces molécules ont été plutôt décrites dans le règne végétal et leur fonction est encore mal connue. Néanmoins, certains siARN se complexent avec des ARNm, suggérant qu'une de leurs fonctions est liée à la régulation de l'expression génique (Ghildiyal and Zamore 2009).

iii. miARN

En 1993, deux équipes américaines (R. C. Lee, Feinbaum, and Ambros 1993; Wightman, Ha, and Ruvkun 1993) montrent que l'abondance de la protéine LIN14, impliquée dans le développement de *Caenorhabditis Elegans*, est régulée par un petit ARN codé par le gène *lin-4*. En 1998, Fire et Mello mettent en évidence que l'injection d'ARN double brin permet une répression extrêmement efficace de l'ARNm, contrairement à des molécules simple brin dont l'effet est modeste et aléatoire. Cette découverte suggérant qu'un processus intra-cellulaire permet d'optimiser l'action des ARN interférence (Fire et al. 1998) sera récompensée par le prix Nobel de médecine en 2006. Cependant, il faut attendre 2000 pour qu'un autre petit ARN très conservé entre les espèces, let-7, soit mis en évidence, validant ainsi le concept d'une régulation de l'expression génique par de petits ARN non codants endogènes (Pasquinelli 2012).

Les miARN sont des ncARN d'environ 22 nucléotides, conservés entre les espèces, impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Actuellement, environ 2600 miARN matures sont identifiés chez l'homme (version 21), régulant près de 60 % des transcrits (R. C. Friedman et al. 2008). Les miARN sont impliqués dans la majorité des processus physiologiques, tel le développement

embryonnaire, le maintien de l'homéostasie cellulaire ou la différenciation cellulaire (Bartel 2009). Les miARN sont également impliqués dans l'immense majorité des processus pathologiques, au premier rang desquels, les néoplasies (Croce and Calin 2005), les pathologies cardio-vasculaires (Small and Olson 2011), les maladies génétiques (Mendell and Olson 2012) et les pathologies neuro-développementales ou psychiatriques (Im and Kenny 2012).

2) Biogenèse et régulation des microARN

a. Biogenèse des miARN

i. Transcription

Environ 40% des gènes codants pour les miARN sont situés dans les régions introniques de gènes codants pour des protéines (Baskerville 2005) et 60% sont situés dans des régions intergéniques. Parfois, des gènes de miARN très proches constituent une unité de transcription polycistronique (Y. Lee et al. 2002). La transcription des miARN est la plupart du temps concomitante du gène dans lequel ils se situent, mais certains d'entre eux possèdent parfois leur propre promoteur (Baskerville 2005). Leur biogenèse et leur maturation sont schématisées dans la Figure 2 (Ha and Kim 2014).

Les gènes des microARN sont transcrits par l'ARN polymérase II en longs transcrits primaires (pri-miARN) de plus de 1000 nucléotides. Les pri-miARN ont une structure en épingle à cheveux (ou tige-boucle) avec une tige d'environ 33 paires de bases imparfaitement appariées, une extrémité 5' comprenant une coiffe méthyl-7-guanine et une queue polyadénylée à l'extrémité 3' (X. Cai 2004).

ii. Maturation nucléaire

Les pri-miARN sont clivés par un complexe protéique comprenant Drosha, une RNase III de type endonucléase clivant les ARN double brin. Cette enzyme possède un site de recrutement pour son co-facteur indispensable, DGCR8 (Di George Syndrom Critical Region 8), qui permet la fixation de l'ARN double brin au sein du complexe (Han 2004; Denli et al. 2004). Ceci aboutit ainsi à la formation d'un pré-miARN en tige-boucle de 60 à 80 nucléotides caractérisé par 2 nucléotides « flottants », non appariés à l'extrémité 3', dits « 3' overhang », signant le clivage par la RNase de type III. Le pré-

miARN est reconnu par l'exportine 5 grâce aux 2 nucléotides « 3' overhang » et est exporté dans le cytoplasme (Okada et al. 2009). La protéine RAN-GTPase (RAs related Nuclear protein – Guanosine Tri-Phosphatase) associée permet la libération du pré-miARN grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de la GTP en GDP (Lund et al. 2004).

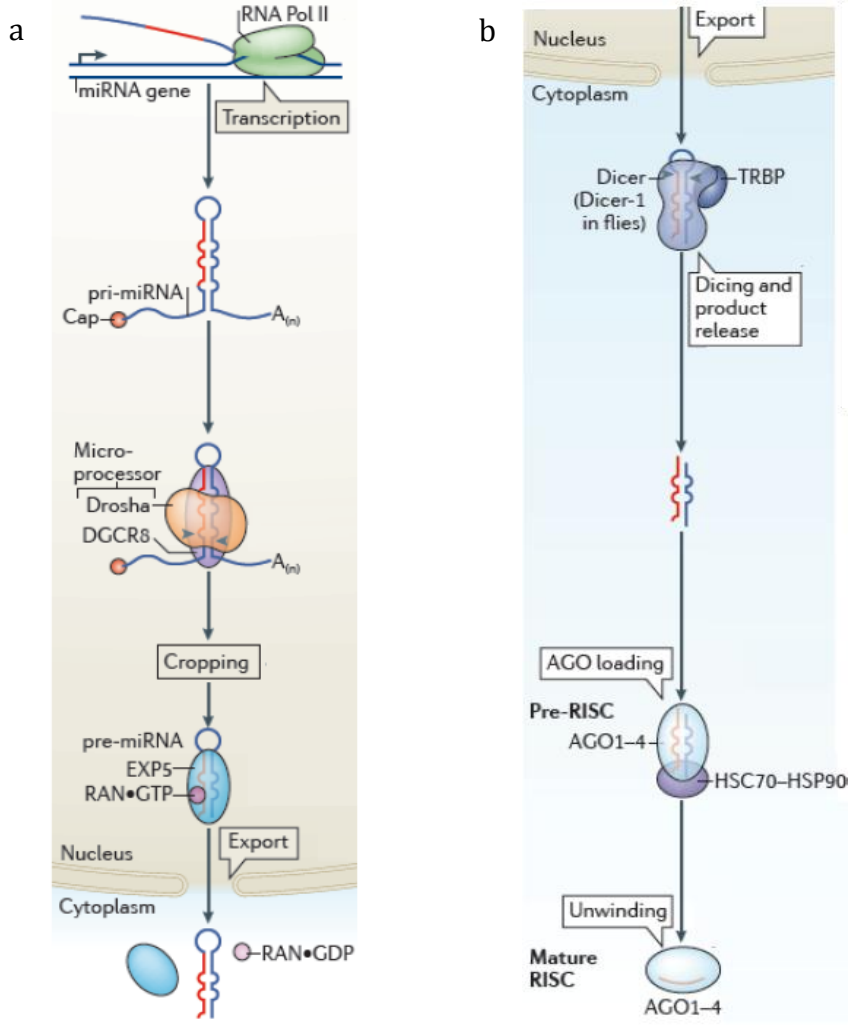


Figure 2 : Représentation schématique de la biogenèse des microARN (miRNA). a : Étapes nucléaires de la maturation : transcription du pri-miARN par l'ARN polymérase II (Pol II), intégration au complexe Drosha/DGCR8 permettant la maturation du pré-miARN et export cytoplasmique par l'exportine 5 (EXP5) en association avec la RAN-GTPase. b : Étapes cytoplasmiques de la maturation : intégration dans le complexe comprenant Dicer et la protéine TRBP (TAR RNA-binding protein) permettant de lier l'ARN double brin, maturation induite par Dicer, libération de l'ARN double brin, intégration dans le complexe protéique AGO1-4 grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse d'un ATP par le complexe heat shock cognate 70 (HSC70) – heat shock protein 90 (HSP90), libération du brin passager, formation du complexe RISC mature. D'après Ha and Kim 2014.

iii. Maturation cytoplasmique

Les pré-miARN sont reconnus dans le cytoplasme grâce à leur extrémité « 3' overhang » par Dicer, une RNase de type III, associée à une protéine de liaison à l'ARN, TRBP (Tar-RNA binding protein) (Bernstein et al. 2003). Le domaine PAZ (PIWI-AGO-ZWILLE) permet la reconnaissance et le positionnement de Dicer, puis le domaine RNAse III excise la boucle du pré-miARN, générant un duplex de miARN de 22 nucléotides (J.-E. Park et al. 2011, 201). L'association avec une protéine Argonaute (AGO 1 à 4) permet la dissociation du complexe (Su et al. 2009). Le brin passager (miARN*) est alors clivé et relargué dans le cytoplasme pour être dégradé (Xuhang Liu et al. 2012). Parfois les 2 brins conduisent à un miARN mature, ils sont alors identifiés par le suffixe -3p ou -5p selon qu'ils proviennent de l'extrémité 3' ou 5' de leur précurseur. Le brin guide, ou microARN mature, persiste au sein du complexe protéique nommé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (Stefanie Jonas and Izaurralde 2015).

iv. Maturation non canonique

Le séquençage des petits ARN à partir des cellules déficientes pour les protéines Drosha ou Dicer a mis en évidence la présence de certains miARN, à l'origine de l'identification de voies de maturation alternatives (Babiarz et al. 2008; J.-S. Yang and Lai 2011). En effet, en l'absence de du complexe Drosha/DGCR8, des mirtrons (produits de l'épissage de certains ARNm) ou des pré-miR avec une coiffe 7-méthylguanosine peuvent être exportés dans le cytoplasme pour être pris en charge par Dicer (Ha and Kim 2014). D'autres pré-miR produits par Drosha/DGCR8 peuvent être incorporés à AGO2 sans clivage préalable pour être ensuite maturés par PARN (Poly(A)-specific Ribonuclease) (Ha and Kim 2014).

b. <u>Régulation</u>

L'expression des microARN est régulée, au même titre que les ARN codants, par des facteurs de transcription et des mécanismes épigénétiques (B. N. Davis and Hata 2010), mais également au cours des différentes étapes de leur maturation et par le complexe RISC lui-même (Siomi and Siomi 2010). Ainsi, les protéines associées à DROSHA et DGCR8 sont impliquées dans la modulation de la maturation en pré-miARN. De plus, il existe de nombreuses boucles de régulation positives permettant

l'amplification d'un signal ou négatives permettant le maintien d'un équilibre (Margaret S. Ebert and Sharp 2012).

3) Mécanismes d'action des miARN

a. *Mécanisme intra-cellulaire*

Au terme du processus de maturation, les miARN sont intégrés au sein du complexe RISC. Ils sont alors capables d'exercer une fonction de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique en réprimant la traduction et en déstabilisant puis en dégradant l'ARNm cible.

i. Reconnaissance de l'ARNm cible par le miARN

Les miARN possèdent une séquence de reconnaissance dite « seed (racine) » comprenant généralement les nucléotides 2 à 7 de la région 5' (Agarwal et al. 2015). Grâce à cette séquence, les miARN reconnaissent par complémentarité leur site de liaison classiquement situé dans la région 3' UTR (UnTranslated Region) de l'ARNm cible. Parfois, le nucléotide 8 participe à la séquence de reconnaissance (R. C. Friedman et al. 2008) (Figure 3A-C). Des sites marginaux ne comprenant que 6 nucléotides appariés sont moins fonctionnels que les sites canoniques (Figure 3D-E). Plus rarement, l'extrémité 3' du microARN joue également un rôle dans la fixation du miARN, en particulier lorsque la complémentarité de la séquence « seed » avec l'ARNm est faible (R. C. Friedman et al. 2008) (Figure 3F-G). Chez la plante, la totalité de la séquence du miARN reconnaît la séquence cible (hormis le 1er nucléotide enfoui dans la protéine Ago2 qui ne participe jamais à la reconnaissance de la cible) (Huntzinger and Izaurralde 2011). Chaque miARN a plusieurs cibles, avec toutefois une fonctionnalité de l'interaction variable. En effet, outre la complémentarité, l'accessibilité de la séquence cible influence la fixation des miARN à leur séquence cible. L'accessibilité est modifiée notamment par la localisation de la séquence cible au sein de la région 3'UTR, le site d'appariement à la séquence « seed », la structure secondaire des ARNm, ou la présence de protéines de liaison à l'ARN (Ameres, Martinez, and Schroeder 2007).

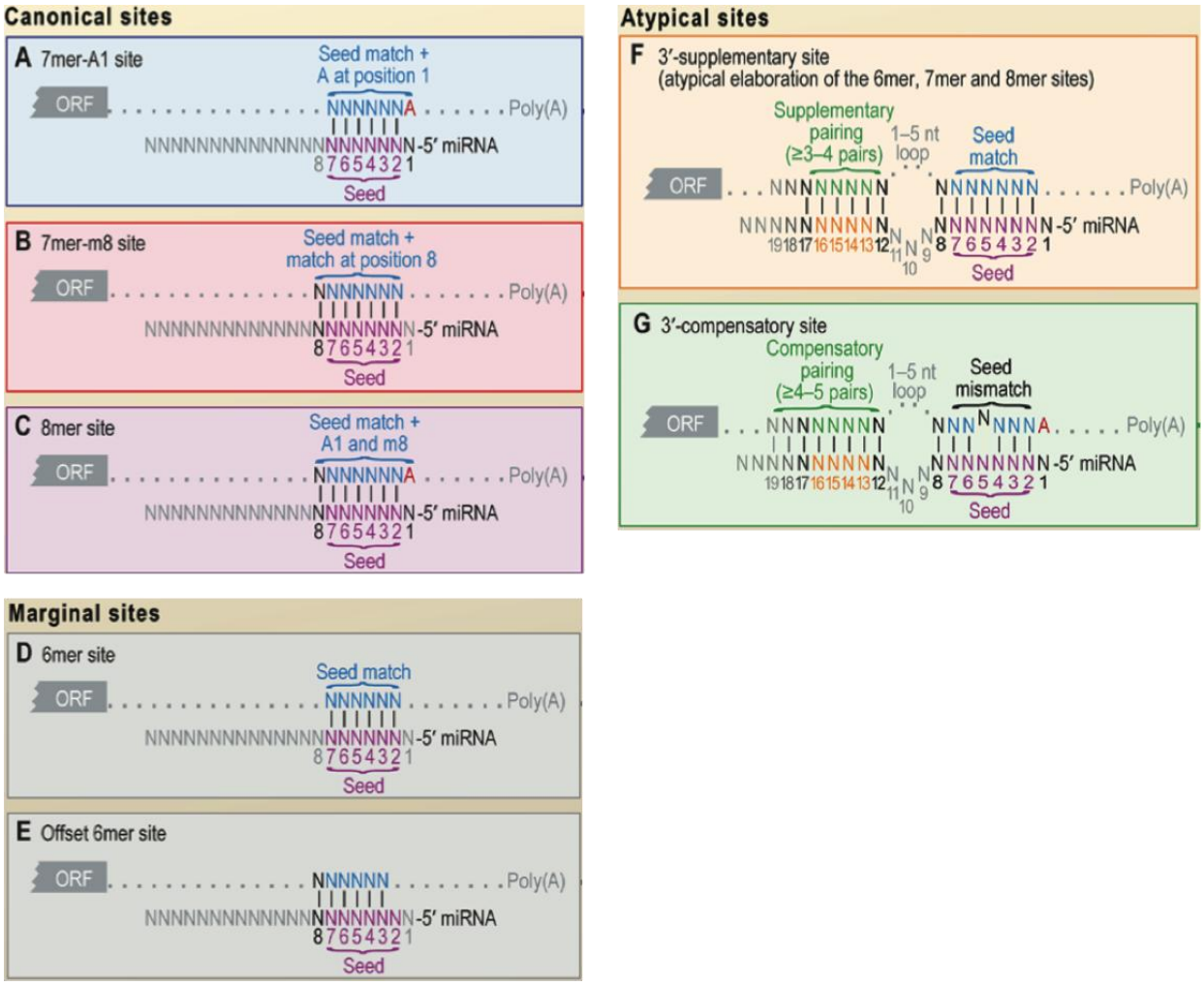


Figure 3 : Règles d'appariement entre un miARN et sa cible. (A-C) Sites d'interaction canoniques, comprenant 7 à 8 nucléotides, impliqués dans la reconnaissance entre un miARN et sa cible. (D-E) Sites d'interaction marginaux, comprenant 6 nucléotides appariés Ces sites « 6mer » ont généralement une efficacité réduite. (F-G) Sites d'interaction atypiques comprenant une seconde zone d'appariement en 3' du miARN. Parfois, ces sites ont un rôle de renforcement d'une interaction canonique (F). Dans d'autres cas, le site 3' est compensatoire d'un appariement incomplet au niveau du site classique (G). Ces sites atypiques permettent l'obtention d'un site fonctionnel. Les tirets verticaux indiquent l'appariement Watson-Crick contigu. D'après Bartel 2009.

ii. Mécanismes de répression

Le complexe RISC permet au miARN d'exercer une action de régulation post-transcriptionnelle. Le noyau central du complexe RISC est formé par le miARN mature et une protéine AGO (1 à 4 chez l'humain) (Figure 4). Les protéines AGO ont une structure bilobaire comprenant un domaine PIWI fixant l'extrémité 5' du miARN, et un domaine PAZ fixant l'extrémité 3'. Le miARN est ainsi positionné de façon optimale en conformation d'hélice α au sein du sillon d'AGO (Ha and Kim 2014).

La complémentarité parfaite des séquences miARN-ARNm cible entraine une dégradation directe de l'ARNm par la protéine Argonaute (Huntzinger and Izaurralde 2011). Ce mécanisme est la règle dans le règne végétal mais reste un mécanisme minoritaire chez les animaux. Chez l'humain, seule AGO2 est dotée d'une activité enzymatique permettant ce clivage (Ipsaro and Joshua-Tor 2015). *A contrario*, on a longtemps pensé qu'une complémentarité imparfaite conduisait à l'inhibition de la traduction sans dégradation de l'ARN. De nombreuses données expérimentales ont montré qu'une diminution de la quantité de l'ARNm cible suite à l'inhibition par un miARN était de loin la situation la plus fréquente, remettant en cause ce paradigme (Huntzinger and Izaurralde 2011). Lorsque l'ARNm n'est pas clivé directement, les protéines AGO recrutent des protéines permettant de réprimer la traduction, puis d'entrainer la désadénylation, l'ablation de la coiffe en 5' et enfin la dégradation de l'ARNm (Huntzinger and Izaurralde 2011).

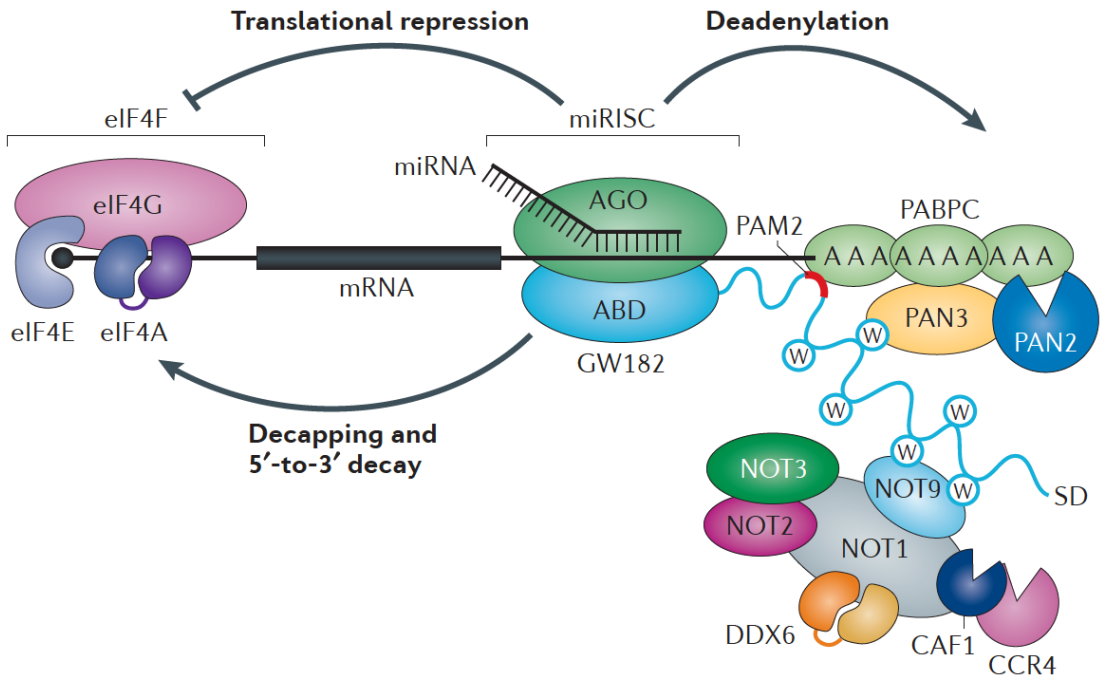


Figure 4 : Mécanismes d'action des miARN animaux sur l'ARNm cible. Le miARN associé à une protéine Argonaute (AGO) au sein du complexe RISC se lie par appariement à un ARNm cible. La protéine GW182, recrutée par AGO, permet à son tour le recrutement de protéines permettant l'inhibition de la traduction (inhibition du complexe eIF4F), la désadenylation (PABPC, complexes cytoplasmiques de désadénylation), le « decapping » (décoiffage) puis la dégradation (dégradation de 5′ en 3′ par l'exoribonuclease 1) de l'ARNm cible. D'après Jonas and Izaurralde 2015.

L'association à une protéine GW182 est indispensable à la fonctionnalité du complexe RISC (Rehwinkel 2005). Cette famille de protéines est constituée d'un domaine N-terminal de liaison à AGO et d'un domaine C-terminal participant au recrutement du complexe de désadénylation.GW182 recrute ainsi deux complexes de désadénylation PAN2-PAN3, CCR4-NOT, ayant des fonctions redondantes. Cependant, le complexe CCR4-NOT est multifonctionnel puisqu'il a également une fonction d'inhibition directe de la traduction (Cooke, Prigge, and Wickens 2010) et qu'il recrute l'enzyme DCP2 (Decapping Protein 2) permettant l'ablation de la coiffe en 5' (S. Jonas and Izaurralde 2013). Enfin, les complexes d'ablation de la coiffe interagissent avec la 5′-to-3′exoribonuclease 1 (XRN1) qui dégrade rapidement les ARNm (S. Jonas and Izaurralde 2013).

La protéine PABPC (Cytoplasmic poly(A)-binding protein), recrutée par GW182, a un rôle qui reste encore débattu (Eulalio, Tritschler, and Izaurralde 2009). PABCP renforce probablement l'ancrage du complexe RISC sur les ARN polyadénylés (Moretti et al. 2012). La liaison de PABPC au complexe RISC pourrait également diminuer son activité de stimulation de la traduction (Huntzinger and Izaurralde 2011).

La répression isolée de la traduction est toutefois parfois observée (Eichhorn et al. 2014). Il est maintenant admis que la répression intervient avant l'initiation, probablement en inhibant l'initiation dépendante de la coiffe en 5' (Stefanie Jonas and Izaurralde 2015), bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents ne soient pas élucidés. Chez la drosophile, Ago 1 peut également inhiber la transcription de façon indépendante de GW182 (Fukaya and Tomari 2012).

iii. Fonctions biologiques

Si la fonction de régulation post-transcriptionnelle de la traduction est bien documentée, le rôle des miARN intégré à l'échelle d'un organisme est plus difficile à appréhender. En effet, la délétion isolée d'un miARN entraine des conséquences phénotypiques variables. Dans certains cas, le phénotype n'est pas modifié, comme c'est le cas pour les souris invalidées pour miR-21 (Chau et al. 2012). Parfois, la délétion d'un miARN entraine un phénotype particulier. Ainsi, les souris invalidées pour miR-122a développent spontanément une stéatose puis une fibrose hépatique, ainsi que des carcinomes hépato-cellulaires (Wen and Friedman 2012). Plusieurs arguments plaident

en faveur du rôle crucial joué par ces petites molécules. En particulier, la délétion complète des enzymes de maturation Dicer (Bernstein et al. 2003) et Drosha (Fukuda et al. 2007) est létale à un stade embryonnaire, et entraine des phénotypes marqués en cas de délétion conditionnelle (J.-S. Yang and Lai 2011). L'hypothèse actuelle est que les miARN jouent un rôle dans la régulation fine des processus biologiques *via* des boucles de rétrocontrôle (Figure 5). Trois mécanismes principaux de régulation sont actuellement décrits et permettent d'expliquer les fonctions fondamentales des miARN. Les boucles d'anticipation (dans lesquelles le miARN régule la même cible que son inducteur) permettent de renforcer et de stabiliser un signal biologique (Figure 5A). Les boucles de régulation négative (dans lesquelles le miARN régule négativement son inhibiteur), quant à elles, maintiennent un état d'homéostasie (Figure 5B). Les boucles de rétrocontrôle positif (dans lequelles le miARN régule positivement son inducteur) sont souvent impliquées dans la différenciation cellulaire et au cours du développement embryonnaire (Figure 5C) (Margaret S. Ebert and Sharp 2012).

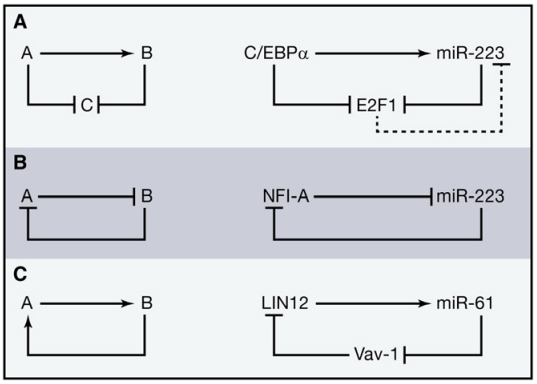


Figure 5 : Boucles de régulation impliquant les miARN. A : Boucle d'anticipation. Exemple de l'inhibition directe et indirecte de E2F1, un régulateur du cycle cellulaire impliqué dans la granulopoïèse. B : Boucle de régulation négative. Exemple de l'inhibition réciproque de miR-223 et NFI-A permettant un maintien de l'équilibre entre précurseurs myéoïdes et granulocytes. C : Boucle de régulation positive. Exemple du renforcement de l'engagement vers la différenciation en cellules vulvaires chez le nématode. D'après Ebert and Sharp 2012.

b. *miARN circulants*

Les microARN sont retrouvés dans les fluides biologiques, en particulier dans le sang et l'urine, mais également dans le liquide céphalo-rachidien, les larmes ou le lait

maternel (Xi Chen et al. 2012a). Ils participeraient ainsi à la communication intercellulaire de manière paracrine ou endocrine (Xi Chen et al. 2012b).

i. Mécanismes de sécrétion

Les miARN circulants sont résistants à la dégradation des RNAses. En effet, leur inclusion dans des microvésicules (Valadi et al. 2007) ou leur association à certaines protéines (K. Wang et al. 2010) permet de les protéger de l'action des RNAses. Bien que les mécanismes soient encore imparfaitement élucidés, trois principales voies de sécrétion ont été décrites : la sécrétion passive, la sécrétion active des miARN au sein de microvésicules et la sécrétion active sous forme de complexes protéines-miARN (Figure 6).

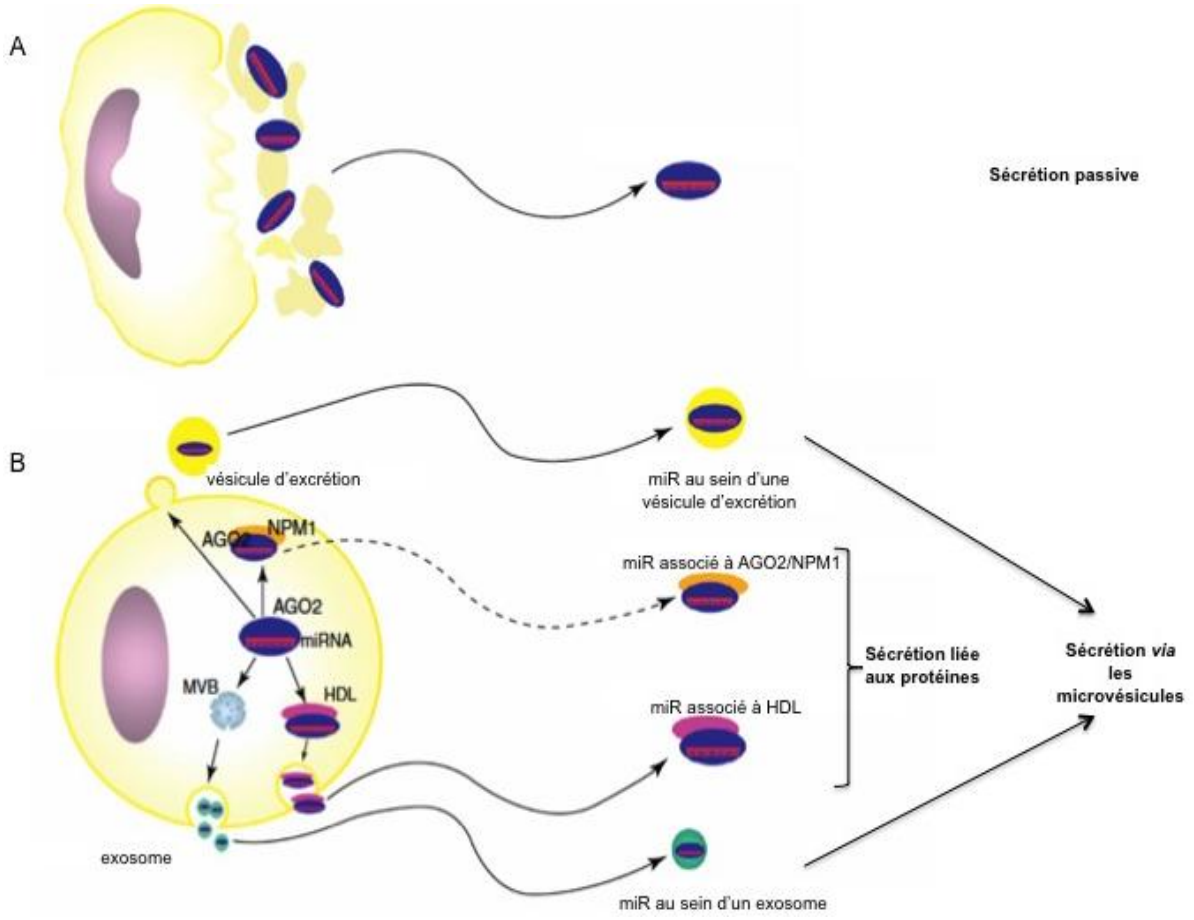


Figure 6 : Mécanismes de sécrétion extracellulaire des miARN. A : Sécrétion passive suite à un dommage cellulaire. B : Sécrétion active des miARN intégrés dans des microvésicules (exosomes ou vésicules de sécrétion) ou associés à des protéines (HDL ou AGO2/NMP1). La flèche discontinue pour AGO2/NMP1 signifie que le caractère actif de cette sécrétion et sa fonctionnalité sont incertaines. AGO2 : Argonaute 2 ; HDL : High Density Lipoprotein ; MVB : MultiVesicular Bodies ; NPM1 : NucleoPhosMin1. D'après Xi Chen et al. 2012b (Xi Chen et al. 2012b).

✓ *La sécrétion passive*

Les lésions tissulaires associées au processus d'apoptose ou de nécrose peuvent entrainer le relargage passif et non sélectif des miARN intracellulaires. Ainsi, les cellules sanguines présentant une demi-vie courte, notamment les plaquettes, participent au contingent de miARN sériques du fait d'une lyse cellulaire constante à bas bruit (Xi Chen et al. 2012b). Les miARN sécrétés passivement seraient biologiquement inactifs (Mitchell et al. 2008).

✓ *La sécrétion active*

Le caractère actif d'une sécrétion est associé à un mécanisme nécessitant de l'énergie. Contrairement à la sécrétion passive, le contenu excrété en miARN ne reflète pas la composition intra-cellulaire en miARN et témoigne de mécanismes conduisant à l'excrétion sélective de certains miARN. C'est le cas de la sécrétion des miARN *via* des microvésicules ou liée aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Les miARN intégrés dans des vésicules représentent une minorité des miARN circulants (Arroyo et al. 2011). On distingue deux types de microvésicules assurant le transport des miARN. D'une part, les exosomes qui sont des vésicules de 30 à 100 nm issues de l'endosome précoce. Sous l'action de la sphingomyélinase neutre 2, une protéine impliquée dans la synthèse des céramides dans les situations de stress cellulaire (Hannun and Obeid 2002), les miARN sont associés aux protéines AGO2 et GW182 (Gibbings et al. 2009). Ils sont par la suite dirigés vers les corps multi-vésiculaires d'exocytose qui fusionnent avec la membrane et libèrent leur contenu vers le milieu extra-cellulaire (Kosaka et al. 2010). D'autre part, le second type de de microvésicules est représenté par le groupe des vésicules d'excrétion. Elles représentent une population plus hétérogène de vésicules de 100 à 1000 nm, créées par invagination externe de la membrane plasmique. Les mécanismes qui conduisent à cette sécrétion active sont non élucidés à l'heure actuelle (Xi Chen et al. 2012b).

Les miARN associés aux HDL sont également biologiquement actifs (Vickers et al. 2011). A l'inverse de la voie des miARN intégrés aux exosomes, la sphingomyélinase neutre 2 inhibe la formation des complexes miARN-HDL (Vickers et al. 2011). Enfin, des miARN circulants liés à AGO2 ou à la nucléophosmine 1 ont été identifiés mais le

caractère actif de leur sécrétion et leur fonction biologique sont incertains (Xi Chen et al. 2012b).

ii. Effet biologique des miARN sécrétés

Les miARN sécrétés *via* les microvésicules peuvent être intégrés dans une cellule cible par endocytose, phagocytose ou fusion des membranes plasmiques (Xi Chen et al. 2012b) et induire un effet biologique de répression de l'expression génique dans la cellule cible (Iguchi, Kosaka, and Ochiya 2010), ainsi que le phénotype en découlant (Yujing Zhang et al. 2010). Les miARN associés aux HDL sont endocytés par un récepteur membranaire aux HDL, le Scavenger Receptor class B type I (SR-BI), et dirigés vers le cytoplasme où ils exercent leur fonction de régulation des ARNm (Vickers et al. 2011). La présence de molécules d'adressage à la surface des microvésicules et de récepteurs spécifiques sur les cellules cibles permet probablement l'adressage spécifique aux cellules cibles, bien que les mécanismes restent imparfaitement élucidés (Xi Chen et al. 2012b).

Les miARN extra-cellulaire peuvent agir par voie autocrine, paracrine ou endocrine. Ainsi, les miARN sécrétés peuvent avoir un effet paracrine lors de l'interaction entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T (Mittelbrunn et al. 2011), lors du développement embryonnaire (Yuan et al. 2009) et dans les contextes tumoraux (Skog et al. 2008). Bien que les miARN soient sécrétés dans la circulation sanguine par des cellules sanguines (Hunter et al. 2008) ou des adipocytes (Müller et al. 2011), leurs cellules cibles ne sont à l'heure actuelle par connues.

II. miR-21 en physiologie et pathologie rénale

1) Biogenèse et contrôle de l'expression de miR-21

Du fait de son implication dans de très nombreuses situations physiologiques et pathologiques, miR-21 est l'un des miARN les mieux caractérisés à l'heure actuelle. De plus, il est quantitavivement un des miARN les plus représentés.

a. Localisation et caractéristiques du gène

miR-21 est l'un des premiers miARN humains dont la structure a été déterminée précisément (X. Cai 2004) (Figure 7). Chez l'homme, le gène correspondant au pri-miR-21 est situé dans le locus 23.2 du bras long du chromosome 17 (17q23.2) au sein du gène *TMEM49*, codant pour la Vacuole Membrane Protein 1, une protéine induite par le stress cellulaire et impliquée dans la formation de vacuoles intra-cytoplasmiques, un stade précoce de l'autophagie et la jonction cellulaire (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VMP1) (X. Xu et al. 2014; Krichevsky and Gabriely 2008). La séquence exacte du pri-miR-21 fait encore l'objet de débat (Kumarswamy, Volkmann, and Thum 2011) mais les études les plus récentes mettent en évidence un transcrit primaire de 477 nucléotides, dont la séquence se situe dans une région allant de l'intron 10 à l'intron 12 du gène *TMEM49*. La séquence correspondant à miR-21 mature est située dans le douzième et dernier intron de *TMEM49*. Cette séquence n'est habituellement pas transcrite dans l'ARNm de *TMEM49*, car elle se situe en aval de la séquence de polyadénylation. Chez l'homme, le brin sens de miR-21 est appelé miR-21-5p, alors que chez la souris, il est appelé miR-21a-5p (www.miRbase.org version 21).

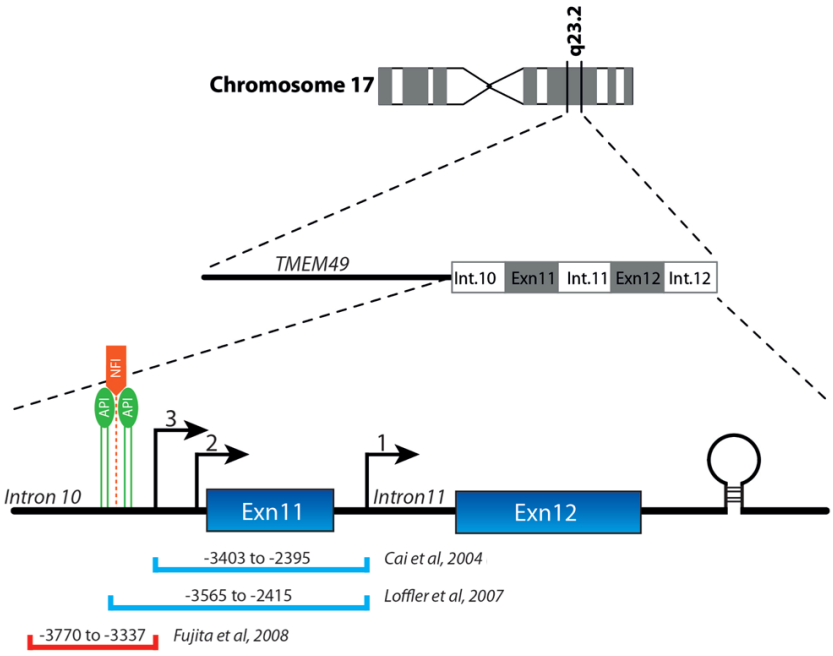


Figure 7 : Localisation génomique de miR-21. Le gène correspondant à miR-21 est localisé sur le chromosome 17q23.2 au sein du gène *TMEM49*. Trois sites d'initiation de la transcription ont été décrits : 1 (Cai 2004), 2 (Fujita 2008) et 3 (Mudduluru et al. 2011). Le site de liaison pour des éléments activateurs (AP1) ou répresseurs (NF1) est situé dans l'intron 10 du gène *TMEM49*. Enfin, les trois régions promotrices décrites sont situées à cheval sur plusieurs introns et exons (intron 10 à 11, Cai 2004 et Loffler 2007) ou dans l'intron 10 (Fujita). D'après Kumarswamy et al. 2011.

Afin d'améliorer la lisibilité du manuscrit, miR-21 sera indistinctement utilisé pour désigner miR-21-5p chez l'homme et miR-21a-5p chez la souris. Le brin anti-sens miR-21-3p est exceptionnellement impliqué dans des processus pathologiques, mais quelques études ont montré son implication dans le cancer (Lo, Tsai, and Chen 2013; Ryan Charles Pink et al. 2015; Báez-Vega et al. 2016) et dans l'hypertrophie cardiaque (Yan et al. 2015).

b. *Régulation*

i. *Régulation de la transcription*

Malgré sa situation intra-génique, miR-21 possède sa propre unité de transcription, lui permettant une régulation indépendante (Kumarswamy, Volkmann, and Thum 2011) (Figure 7). Le premier site promoteur, décrit en 2004 (X. Cai 2004), est situé 3403 à 2395 paires de bases en amont de la séquence correspondant au pri-miR-21 est concordant avec un site de début de transcription situé dans l'intron 11 du gène de *TMEM49*. Un site très similaire a été décrit trois ans plus tard par Loffler *et al* (Loffler et al. 2007). Ce site ne semble cependant pas être déterminant, puisqu'il est épissé au cours de la formation du pri-miR-21. Un second site promoteur situé 3770 à 3337 paires de bases en amont de la séquence correspondant au pri-miR-21 a été décrit en 2008 (Fujita et al. 2008) et recoupe de façon minimale le site promoteur décrit précédemment. Plus récemment, Mudduluru *et al.* ont décrit plusieurs sites d'initiation de la transcription très proches de celui décrit par Fujita (Mudduluru et al. 2011).

La Figure 8 représente les différents sites de fixation des facteurs de transcription identifiés par Fujita *et al*. Les techniques de ChIP (Chronmatin ImmunoPrecipitation) – séquençage ont permis de valider l'implication de plusieurs facteurs de transcription (Fujita et al. 2008) modulant positivement ou négativement l'expression de miR-21. La diversité des voies associées à ces facteurs de transcription reflète la complexité de la régulation de miR-21.

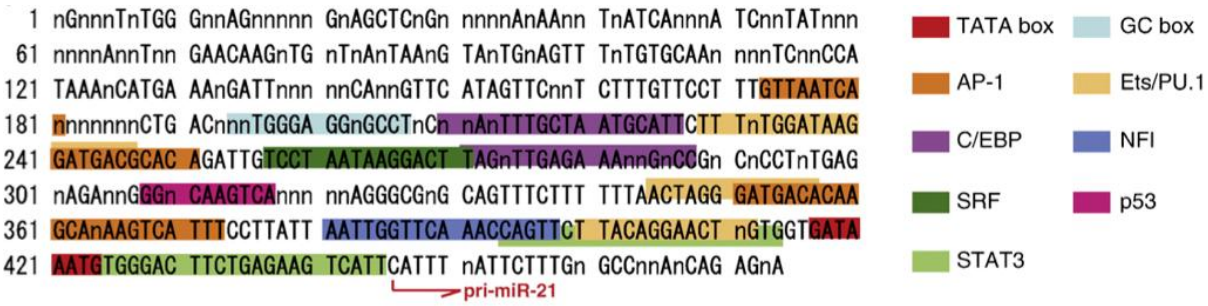


Figure 8 : Séquence de la région promotrice de miR-21. Les bases conservées entre les espèces sont en majuscules, les bases variables sont symbolisées par un « n ». Les sites de fixation des facteurs de transcription et les sites nécessaires à la transcription (TATA box et GC box) sont surlignés en couleur. AP-1 : Activator Protein 1 ; C/EBP : CCAAT-Enhancer-Binding Proteins ; ETS/PU.1 : E26 Transformation-Specific / protein PU.1 ; NFI : Nuclear Factor I ; SRF : Serum Responding Factor ; STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3. D'après Fujita et al. 2008.

La majorité des facteurs de transcription validés sont activateurs :

- Ainsi, plusieurs sites de liaison pour le facteur de transcription AP-1 (Activator Protein 1), un hétérodimère composé des protéines c-Fos etc-Jun, ont été mis en évidence. AP-1 recrute le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF afin de permettre l'initiation de la transcription du pri-miR-21 (Ito et al. 2001). La protéine PU.1, appartenant à la famille des facteurs de transcription Ets (comprenant un domaine ETS (E26 Transformation-Specific) de liaison à l'ADN et reconnaissant une courte séquence centrale GGAA/T (Graves and Petersen 1998), exerce une action synergique avec AP-1 (Fujita et al. 2008; Chinenov and Kerppola 2001).

- Deux sites de fixation pour le facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding) phosphorylé ont été décrits. Leur fixation sur le promoteur entraine une activation de la transcription de miR-21 (Polytarchou et al. 2011).

- Deux sites de fixation pour STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), un facteur de transcription activé par des cytokines (en particulier IL-6) et impliqué dans la survie et la migration cellulaires, ont été décrits (Loffler et al. 2007; Luo et al. 2014). STAT3 semble nécessiter la présence de co-facteurs pour être actif. En effet, il a été récemment démontré que le facteur C/EBP jouait également un rôle synergique avec STAT3 (McClure et al. 2016). De plus, la présence de la sous-unité

p65 du NFκB sur un site de fixation très proche de celui de STAT3 semble nécessaire à l'action promotrice de STAT3 (Z. Yang et al. 2015).

- Le récepteur aux androgènes est également capable de se fixer sur la séquence promotrice de miR-21 et d'en induire la transcription (Ribas et al. 2009).

- Il existe deux sites de liaisons potentiels pour HIF-1α (Hypoxic Inducible Factor-1α) dans le promoteur de miR-21. Un seul d'entre eux a été validé par des techniques d'immunoprécipitation et de gène rapporteur. Toutefois, l'action de HIF-1 nécessite la présence du co-facteur CBP (CREB Binding Protein)/p300 (Yang Liu et al. 2014). Il existe une boucle de rétrocontrôle positif *via* Akt (Yang Liu et al. 2014).

- D'autres molécules entrainant une régulation positive de miR-21 ont été évoquées dans la littérature sans que le mécanisme exact ne soit étudié. Il s'agit, entre autres, du facteur NFκB associé au complexe mTor (mammalian Target of rapamycin) (Vinciguerra et al. 2009), de la protéine p53 pour laquelle un site de fixation au sein du promoteur avait été identifié par Fujita (J. Yang et al. 2015) ou de la protéine FRA-1 (Horita et al. 2011).

D'autres facteurs régulent négativement la transcription :

- NF1-B (Nuclear Factor 1 B), un membre de la famille des protéines NF1 entrainant une répression versatile de l'expression génique, joue un double rôle dans la régulation de miR-21. En effet, il se fixe sur le site promoteur (décrit par Fujita) pour réprimer la transcription de miR-21. De plus, il intervient dans une boucle de régulation négative, la séquence NF1-B contenant un site de fixation pour miR-21. Le facteur de transcription C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding Proteins) est un autre répresseur de l'expression de miR-21, synergique de NF1-B (Fujita et al. 2008).

- Un site de fixation à l'œstradiol, exerçant un effet répresseur, a également été décrit (Wickramasinghe et al. 2009).

Enfin, dans certains cas, un facteur de transcription peut exercer deux effets opposés en fonction du contexte cellulaire, et en particulier des cofacteurs associés. C'est le cas du facteur de transcription SRF (Serum Responding Factor), impliqué dans la différenciation et la prolifération cellulaires, qui possède un site de fixation sur le

promoteur de miR-21. Seul, il exerce un modeste effet répresseur. Par contre, il exerce un effet inducteur lorsqu'il est présent associé à la myocardine et un effet de répresseur en association avec le complexe p49/Strap (X. Zhang et al. 2011).

- ✓ *Régulation de la maturation*

La régulation de la maturation de miR-21 ajoute un degré de complexité au contrôle du niveau intra-cellulaire de miR-21 mature. En effet, différentes protéines peuvent s'associer aux complexes de maturation comprenant Drosha ou Dicer. Ainsi, SMAD3 régule positivement miR-21 à un niveau post-transcriptionnel (Brandi N. Davis et al. 2008; Zhong et al. 2011). L'association de SMAD3 au complexe Drosha/DGCR8/p68, facilitant ainsi le clivage du pri-miR-21 en pré-miR-21 est actuellement l'hypothèse privilégiée (Loboda et al. 2016). De plus, l'everolimus (un inhibiteur de mTOR utilisé comme immunosuppresseur en transplantation d'organes solides, dans la sclérose tubéreuse de Bourneville et dans certains cancers) joue également un rôle favorisant la maturation de pri-miR-21 médiée par l'enzyme Drosha (Trindade et al. 2013).

- ✓ *Régulation de la disponibilité de miR-21 mature*

Enfin, différentes molécules peuvent séquestrer des copies de miR-21 mature, entrainant ainsi un degré de régulation rapide et réversible. L'équipe d'Androsavitch *et al*. a montré que l'interaction miR-21-ARNm cible est thermodynamiquement instable, du fait d'une richesse importante en adénines et en uraciles de la séquence « seed » (Androsavich et al. 2012), expliquant ainsi la grande sensibilité de miR-21 au phénomène « d'éponge à miARN». Les « éponges à miARN » sont en effet des molécules comprenant plusieurs sites de fixation pour un microARN donné, ou plus largement pour une famille de miARN se fixant sur une même séquence cible. Elles entrainent une séquestration du miARN et par conséquent celui-ci ne peut interagir avec ses cibles. Ce phénomène se traduit *in vivo* par un degré d'association de miR-21 aux polysomes (et donc le caractère actif) très variable selon le contexte cellulaire. A titre d'exemple, il a été montré que miR-21 est peu associé aux polysomes dans le tissu hépatique de souris saines, traduisant une faible activité de répression de la traduction (Androsavich et al. 2012). Au contraire, une forte association de miR-21 aux polysomes dans les cellules HeLa (adénocarcinome cervical) atteste d'une activité intense dans ce contexte

(Maroney et al. 2006). Ainsi, miR-21 est disponible au sein de la cellule sous forme inactive et peut être libéré rapidement en fonction du contexte cellulaire.

Des « éponges à miARN » endogènes ont été mises en évidence pour la première fois chez la plante en 2007 (Franco-Zorrilla et al. 2007). Certains lncARN peuvent exercer cette fonction de séquestration. En particulier, GAS5 (Growth Arrest Specific 5), un lncARN suppresseur de tumeur exprimé en situation de stress cellulaire (Pickard and Williams 2015), possède un site de reconnaissance pour miR-21 à l'origine d'une régulation négative conjointe des deux molécules (Ziqiang Zhang et al. 2013). Des « éponges à miARN » exogènes sont utilisées à visée expérimentale depuis une dizaine d'années (M. S. Ebert and Sharp 2010), *in vitro* (Margaret S Ebert, Neilson, and Sharp 2007; Sayed and Abdellatif 2011) ou dans des modèles animaux (C. Du et al. 2009). Il a également été évoqué que des pseudogènes peuvent intervenir dans ce phénomène. Les pseudogènes comprennent fréquemment des mutations non-sens situées au début de la séquence codante, aboutissant à un transcrit court qui ne sera pas pris en charge au sein des polysomes. Ainsi, les miARN séquestrés par les pseudogènes sont localisés en dehors des polysomes. En particulier, le pseudogène PTENP1, qui est une cible de miR-21, pourrait contribuer à la régulation de son activité (Poliseno et al. 2010; R. C. Pink et al. 2011).

Enfin, outre les molécules spécifiques ayant une fonction « éponge à miR-21 », la multiplicité des cibles de miR-21 *in vivo* pourrait contribuer à la « dilution » de l'effet de miR-21 sur chacune de ses cibles (Androsavich et al. 2012).

c. *Expression de miR-21 en situation physiologique et pathologique*

Bien que miR-21 soit exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme, ce miARN présente de fortes variations d'expression inter-tissulaires (Landgraf et al. 2007) et une franche surexpression dans les tissus tumoraux (Pfeffer, Yang, and Pfeffer 2015).

Les souris invalidées pour miR-21 ont une fertilité normale et ne présentent pas d'anomalies phénotypiques majeures des principaux organes jusqu'à dix-huit mois de vie (X. Ma et al. 2011; Chau et al. 2012). De même, l'étude du transcriptome dans le foie de souris *miR-21*$^{-/-}$ ne montre pas de modification significative par rapport à des souris sauvages, en particulier sur les ARNm cibles validés de miR-21 (Androsavich et al. 2012).

miR-21 est impliqué dans de nombreux processus physiologiques, en particulier dans le développement. En effet, il est exprimé de façon précoce au cours du développement chez le poisson zèbre (P. Y. Chen et al. 2005), chez la souris (Cao et al. 2012) et joue un rôle dans la morphogenèse ramifiée (Hayashi et al. 2011), nécessaire au développement rénal, pulmonaire et endocrine. De plus, miR-21 pourrait également avoir un rôle de facteur de croissance au cours du développement. En effet, le taux placentaire de miR-21 a été positivement associé à la macrosomie fœtale (H. Jiang et al. 2014). Cependant, la délétion de miR-21 a peu de retentissement sur le développement embryonnaire des souris invalidées pour miR-21, suggérant qu'il existe des voies redondantes dans ce contexte.

Par ailleurs, miR-21 a été identifié comme un acteur important dans de nombreuses pathologies, en dehors des atteintes rénales. Ainsi, miR-21 est augmenté dans la très grande majorité des cancers (Pfeffer, Yang, and Pfeffer 2015), mais également dans les pathologies cardio-vasculaires, en particulier l'athérome (Kumar et al. 2014), la régénération cardiaque post-infarctus (Tao et al. 2015), les anévrysmes aortiques (Fu et al. 2015), les maladies cérébro-vasculaires (Volný et al. 2015), le diabète (Sekar et al. 2016) ou l'inflammation (Sheedy 2015). La modulation de l'expression de miR-21 a permis de préciser son rôle au cours du développement de certaines pathologies. Ainsi, la délétion de miR-21 peut conférer un phénotype de résistance aux tumeurs, notamment pulmonaires, chez des souris prédisposées par une mutation activatrice de l'oncogène K-ras (Hatley et al. 2010). Par ailleurs, la surexpression de miR-21 dans un modèle murin d'induction par la doxycycline conduit au développement d'un phénotype de lymphome malin pré-B (Medina, Nolde, and Slack 2010). Enfin, les souris déficientes pour miR-21 présentent un défaut marqué de réponse immunitaire Th2 (Lu et al. 2011).

2) Implication de miR-21 en physiologie rénale

a. Expression rénale de miR-21

miR-21 est fortement exprimé dans le tissu rénal normal de souris, en particulier par les cellules tubulaires proximales (Chau et al. 2012; Gomez et al. 2015). Chez le rat, l'expression de miR-21 est retrouvée dans le cortex et la médullaire rénale (Saikumar et

al. 2012). Sur des biopsies humaines, miR-21 est exprimé surtout dans le compartiment tubulo-interstitiel mais il est également exprimé, dans une moindre mesure, dans le glomérule (McClelland et al. 2015), notamment dans les podocytes (Zhong et al. 2011; Zhong et al. 2013; Chau et al. 2012). De plus, le profil d'expression génique du tissu rénal des souris *miR-21*$^{-/-}$ est sensiblement identique à celui de souris sauvages dans des conditions normales, en particulier en ce qui concerne les cibles potentielles de miR-21 (Chau et al. 2012).

b. Développement rénal

De nombreux miARN sont impliqués dans l'embryogenèse et le développement (Laurent 2008). Plusieurs études ont ainsi illustré l'importance des miARN dans la néphrogenèse. En particulier, la délétion conditionnelle de Dicer dans les cellules progénitrices rénales conduit à un phénotype très sévère de réduction néphronique associée à une apoptose accrue et à des défauts architecturaux avec une mortalité des souris à 36h post-partum (Nagalakshmi et al. 2011; Ho et al. 2011). Des délétions de Dicer plus ciblées dans les cellules du stroma cortical (Nakagawa et al. 2015), dans les podocytes (Ho et al. 2008; Harvey et al. 2008) et dans les cellules juxta-glomérulaires (Sequeira-Lopez et al. 2010) entrainent différentes anomalies de néphrogenèse, touchant les cellules rénales dont les podocytes et les cellules tubulaires ou la microvascularisation. Par contre, la délétion de miR-21 seul n'entraine pas de défaut de néphrogenèse (Chau et al. 2012) et l'ultra-structure rénale est strictement normale à 12 semaines de vie (Lai et al. 2015).

c. Régénération rénale : l'exemple de Nothobranchius Furzeri

Si le nombre de néphrons matures est fixé dès la naissance chez les mammifères, les vertébrés inférieurs, en particulier les poissons, ont des capacités de néphrogenèse en réponse à une agression rénale (Salice et al. 2001). En effet, en cas de lésion rénale, une population de cellules progénitrices s'active afin de constituer de nouveaux néphrons, reconnaissables par la présence de cellules basophiles (Diep et al. 2011). Un travail mené sur la régénération rénale chez le poisson *Nothobranchius Furzeri* après injection de gentamycine a permis d'observer une augmentation de l'expression de miR-21 après la lésion rénale, en particulier dans les cellules proliférantes (Hoppe et al. 2015). De plus, l'injection préalable d'un antagoniste de miR-21 entraine un retard dans

la récupération rénale. L'analyse par Gene Ontology montre que la plupart des gènes modifiés par l'antagoniste de miR-21 sont liés au processus apoptotique à un stade précoce (J2) et à des mécanismes de réorganisation cellulaire (invagination de la membrane, homéostasie de la cellule) à un stade plus tardif.

3) miR-21 au cours d'une agression rénale

a. miR-21 en pathologie rénale humaine

miR-21 est associé au développement de nombreuses pathologies rénales aigues et chroniques. En effet, plusieurs études translationnelles ont été menées afin d'évaluer l'expression dans le rein, le sang et l'urine de patients porteurs de pathologies rénales variées. Les études répertoriées en pathologie rénale humaine sont reprises de manière synthétique dans le Tableau 1. Elles mettent unanimement en évidence une augmentation de l'expression rénale de miR-21 au cours des situations pathologiques rénales aiguës ou chronique indépendamment de l'étiologie sous-jacente.

Les données concernant miR-21 dans les liquides biologiques sont plus contradictoires, parfois pour d'une même pathologie. La diversité des pathologies rénales impliquant miR-21 souligne son rôle d'acteur ubiquitaire au cours des lésions rénales aigues et chroniques sans spécificité pour une pathologie donnée. Toutefois ces études, chez l'homme, ne permettent pas d'affirmer la responsabilité de miR-21 dans le processus pathologique ni d'étudier les mécanismes sous-jacents impliqués.

b. miR-21 dans les modèles animaux de pathologie rénale

De nombreux modèles animaux ont permis d'explorer le rôle de miR-21 au cours des néphropathies, qu'il s'agisse de modèles d'insuffisance rénale aiguë ou de pathologies rénales chroniques (Tableau 2). Dans la plupart des modèles animaux, l'expression de miR-21 est augmentée après une agression rénale. Le niveau d'expression de miR-21 semble associé à des formes plus sévères de maladie rénale. Cependant, des données contradictoires ont été rapportées dans les modèles les mieux documentés, principalement dans les modèles de néphropathie diabétique et dans les protocoles d'ischémie-reperfusion.

L'exemple le plus frappant est lié aux modèles d'ischémie-reperfusion, modélisant les lésions rénales aiguës. Bien que les différentes études rapportent de manière consensuelle l'augmentation de miR-21 après un épisode d'ischémie-reperfusion (Godwin et al. 2010; Chau et al. 2012; Saikumar et al. 2012; Xialian Xu et al. 2012; Kaucsár et al. 2013; Jia, Teng, Zou, Fang, Zhang, et al. 2013; J. Chen et al. 2015; Li et al. 2016a; Xiujuan Liu et al. 2015; W. Zhang and Shu 2016; Jiao et al. 2016; Xialian Xu et al. 2016), les données divergent en ce qui concerne le caractère protecteur ou délétère de miR-21. En effet, dans la majorité des études, l'inhibition de miR-21 conduit à une aggravation des lésions histologiques et une diminution de la fonction rénale (Xialian Xu et al. 2012; Jia, Teng, Zou, Fang, Zhang, et al. 2013; Xiujuan Liu et al. 2015; Xialian Xu et al. 2016) après ischémie-reperfusion, même si une intervention de préconditionnement protecteur telle qu'une injection de chlorure de cobalt (Xialian Xu et al. 2016), une inhalation de Xenon (Jia, Teng, Zou, Fang, Zhang, et al. 2013) ou un préconditionnement ischémique (Xialian Xu et al. 2012), était appliquée. Un travail montre que l'inhibition de miR-21 avant l'ischémie-reperfusion entraine une aggravation des lésions histologiques et de la fonction rénale 24h après l'ischémie (Xiujuan Liu et al. 2015). *A contrario*, une étude a montré que l'inhibition de miR-21 dès J-5 améliore les lésions histologiques et l'albuminurie 7 jours après la lésion ischémique (Chau et al. 2012). Les principaux éléments qui peuvent expliquer la différence entre ces deux études sont, d'une part, le schéma d'injection de l'inhibiteur de miR-21 variable (respectivement injection unique à J-1 *versus* injections réitérées à J-5, J-2, J+1) et d'autre part, le délai de prélèvement du rein (respectivement précoce à 24h *versus* tardif à 7 jours). En synthèse, ces travaux contradictoires pourraient suggérer que miR-21 joue un rôle protecteur au stade précoce des lésions l'ischémie-reperfusion, en particulier dans les manœuvres de pré-conditionnement, mais qu'il joue un rôle secondairement délétère, une fois les lésions de nécrose tubulaire aigue initiées.

En ce qui concerne la néphropathie diabétique, un modèle de néphropathie chronique, la plupart des modèles plaident en faveur d'un rôle délétère de miR-21. L'expression rénale de miR-21 s'élève assez précocement : dès quatre semaines pour le modèle de diabète induit par l'injection de streptozotocine et après 8 semaines pour le modèle de souris db/db (Zheng Zhang et al. 2009) (modèle de néphropathie diabétique précoce) (Lai et al. 2015). Cinq des six modèles explorant les effets de

Tableau 1 : Implication de miR-21-5p en pathologie rénale humaine.

Pathologie concernée	miR-21-5p tissulaire	miR-21-5p circulant	miR-21-5p urinaire	miR-21-5p autre site	Référence
« Acute kidney injury » (AKI)		miR-21-5p circulant ↘ avant geste chirurgical prédictif d'AKI post- chirurgie cardiaque			Gaede et al. 2016
	miR-21-5p rénal ↗ patients greffés avec une nécrose tubulaire aigue		miR-21-5p urinaire ↗ - prédictif d'AKI lors d'intoxication au paracétamol - après infusion pleurale de cisplatine (non prédictif d'AKI)		Pavkovic et al. 2016
		miR-21-5p urinaire et sérique ↗ chez les patients avec AKI post-chir cardiaque prédictif d'aggravation			J. Du et al. 2013
			miR-21-5p urinaire ↗ chez les patients atteints d'AKI		Ramachandran et al. 2013
			miR-21-5p urinaire ↗ chez les patients atteints d'AKI		Saikumar et al. 2012
Néproangio-sclérose			miR-21-5p urinaire ↗ associé à meilleure survie rénale		Szeto et al. 2012

Néphropathie diabétique		miR-21-5p circulant ↗ associé avec - DFG bas - Protéinurie élevée - Progression de i'IRC			Chien et al. 2016
		miR-21-5p circulant ↗ associé à dégradation de la fonction rénale			Pezzolesi et al. 2015
		miR-21-5p circulant ↗ non associé à néphropathie (associé à événement CV)			Olivieri et al. 2015
	miR-21-5p rénal ↗ associé à - fonction rénale altérée - protéinurie - fibrose (glom. et interst.)				McClelland et al. 2015
	miR-21-5p glomérulaire ↗ associé avec protéinurie				Lai et al. 2015
	miR-21-5p rénal ↗ chez les patients diabétiques				Fiorentino et al. 2013
			miR-21-5p urinaire ↗ (*vs* contrôles sains)		Konta et al. 2014
			miR-21-5p urinaire ↗ associé à : - meilleure fonction rénale - moins de lésions fibreuses (glomérulaires et interstielles)		G. Wang et al. 2013
			miR-21-5p urinaire ↗ associé à meilleure survie rénale		Szeto et al. 2012

Transplantation rénale			miR-21-5p urinaire ↗ chez les patients avec FIAT		Zununi Vahed et al. 2016
				miR-21-5p dans le perfusat de rein de donneurs à cœur arrêté ↗ associé à une moins bonne fonction rénale à 6 et 12 mois.	Khalid et al. 2016
	miR-21-3p rénal ↗ chez les patients qui développent une AKI post-transplantation				Wilflingseder et al. 2014
	miR-21-5p ↗ patients avec FIAT sévère	miR-21-5p sérique ↗ patients avec FIAT grade 3			Glowacki et al. 2013
	miR-21-5p rénal ↗ associé à fonction et survie du greffon et fibrose rénale				Ben-Dov et al. 2012
Néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA	miR-21-5p interstitiel ↗ associé à - fibrose glomérulaire et interstitielle - survie rénale				Hennino et al. 2016
	miR-21-5p ↗ glomérules et tubules associé à - fibrose glomérulaire et interstitielle - protéinurie, fonction rénale				Bao et al. 2014
			miR-21-5p urinaire ↗ associé à une meilleure fonction rénale		G. Wang et al. 2013
			miR-21-5p urinaire ↗ associé à meilleure survie rénale		Szeto et al. 2012

Lésions glomérulaires minimes			miR-21-5p urinaire ↗ patients porteurs de lésions glomérulaires minimes		Konta et al. 2014
PKRD	miR-21-5p ↗ dans la paroi des kystes				Lakhia et al. 2015

Abbréviations : AKI : Acute Kidney Injury ; CV : cardio-vasculaire, DFG : Débit de filtration glomérulaire ; FIAT ; Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire ; LB : Lymphocyte B ; LT : Lymphocyte T ; ND néphropathie diabétique ; PKRD : Polykystose Rénale autosomique Dominante.

Tableau 2 : Implication de miR-21a-5p dans des modèles murins de néphropathies aiguës et chroniques.

Pathologie concernée	**Effet de miR-21a-5p**	**Modèle animal**	**Modification de miR-21a-5p dans le modèle**	**Cibles moléculaires :** (*type cellulaire* : **cible directe de miR-21a-5p**)	**Référence**
« Acute kidney injury » (AKI)	protecteur	Souris ischémie-reperfusion Chlorure de cobalt (protecteur) Inhibition de miR-21a-5p (LNA)	miR-21a-5p ↗ rein Inhibition de miR-21a-5p : ↗ fonction rénale ↗ lésions histologiques	*Cellules endothéliales de veine ombilicale (humain)* : **thrombospondin-1**	Xialian Xu et al. 2016
		Souris ischémie-reperfusion préconditionnement ischémique (protecteur) Inhibition de miR-21a-5p (LNA)	miR-21a-5p ↗ rein total après préconditionnement Inhibition de miR-21a-5p : Perte du bénéfice du préconditionnement (fonction rénale, histologie)	*HK2* : **PHD2** – HIF1	Jiao et al. 2016
		Rats ischémie-reperfusion Ghreline (protecteur)	miR-21a-5p ↗ miR-21a-5p ↗↗ avec ghreline	*Cellules NRK-52E* (épithélium rénal rat): **PTEN** –Akt **Bcl2**	W. Zhang and Shu 2016
		Souris ischémie-reperfusion préconditionnement ischémique (protecteur)	miR-21a-5p ↗ dès 24h après préconditionnement	*HEK-296 (rein embryonnaire humain)* et HK-2 (rein tubule humain) : **MKK3** – p38 MAPK – IL-6/TNF-α	Li et al. 2016a
		Rat ischémie-reperfusion Inhibition de miR21 (oligonucléotides)	miR-21a-5p ↗ dans rein total Inhibition de miR-21a-5p : Aggravation fonction rénale ↗ lésions histologiques	*Cellules NRK-52E* (épithélium rénal rat): **Rab11a**	Xiujuan Liu et al. 2015
		Souris ischémie-reperfusion, préconditionnement au xénon (protecteur) Inhibition de miR-21a-5p (LNA)	miR-21a-5p ↗ rein miR-21a-5p ↗↗ avec xénon Inhibition de miR-21a-5p : Perte du bénéfice du Xénon (fonction rénale, histologie)	**PTEN** – Akt **PDCD4** HIF1	Jia et al. 2013a

AKI (suite)	protecteur (suite)	Rat injections de gentamycine préconditionnement au xénon (protecteur)	miR-21a-5p ↗ rein miR-21a-5p ↗↗ avec xénon		Jia et al. 2013b
		Souris ischémie-reperfusion préconditionnement ischémique (protecteur) Inhibition de miR-21a-5p (LNA)	miR-21a-5p ↗ rein total après préconditionnement (4h-4j) <u>Inhibition de miR-21a-5p</u> : Perte du bénéfice du préconditionnement (fonction rénale, histologie) Pas d'effet en l'absence de préconditionnement	*Cellules rénales épithéliales (humain)* : **PDCD4** HIF1	Xialian Xu et al. 2012
		Souris ischémie-reperfusion	miR-21a-5p ↗ rein (J1 à J30) KO miR-21a-5p délétère dans le modèle cellulaire	*Cellules tubulaires (souris)* : **PDCD4**	Godwin et al. 2010
	délétère	Rat néphropathie à l'acide aristolochique	miR-21a-3p ↗ rénal et plasmatique		Pu et al. 2016
		Souris ischémie-reperfusion EPO (protecteur)	miR-21a-5p ↗ rein ↘ miR-21a-5p rein	Wnt-ß-cathénine	Xiao Chen et al. 2015
		Rat injection de cisplatine	miR-21a-5p urinaire ↗		Pavkovic et al 2014
		Souris ischémie-reperfusion	miR-21 ↗ rein 24h post reperfusion		Kaucsár et al. 2013
		Rat ischémie reperfusion Rat AKI à la gentamycine	miR-21a-5p ↗ cortex ↗↗ médullaire ↘ miR-21-a-5p sérique ↗ miR-21-5p urinaire miR-21a-5p ↗ cortex et médullaire ↘ miR-21a-5p sérique et urinaire		Saikumar et al. 2012
		Souris ischémie reperfusion Inhibition de miR-21a-5p (KO ou oligonucléotide)	↗ miR-21a-5p rein <u>Inhibition miR-21a-5p :</u> Protection contre lésions de fibrose	*Myofibrobastes, cellules épithéliales rénales* : ERK/MAPK **PPARα** MPV17-like **RECK**	Chau et al. 2012

Transplantation rénale	délétère	Souris régime hyposodé Ciclosporine 50 mg/kg/j	miR-21a-5p ↗ rein total maximum à 2 semaines de traitement puis diminution	*Cellules tubulaires proximales (humain) :* **PTEN** – Akt	J. Chen et al. 2015
Néphropathie diabétique (ND)	protecteur	Souris diabète induit par streptozotocine Inhibition de miR-21a-5p (KO)	miR-21a-5p ↗ rein <u>KO miR-21a-5p</u> : ↗ protéinurie ↘ fonction rénale ↗ glomérulosclérose	*Podocytes (souris)* : **SMAD7** **PDCD4** p53 **TIMP3**	Lai et al. 2015
		Souris db/db (déficit du récepteur à la leptine) Surexpression de miR-21a-5p (plasmide)	miR-21a-5p ↘ rein total <u>Surexpression miR-21a-5p</u> : ↘ prolifération mésangiale ↘ albuminurie	*Cellules mésangiales (souris) :* **PTEN** - PI3K - Akt	Zheng Zhang et al. 2009
	délétère	Souris diabète induit par streptozotocine Analogue du curcumin (C66) Inhibition de miR-21a-5p (LNA)	C66 ↘ miR-21a-5p rein <u>Inhibition miR-21a-5p :</u> - ↘ albuminurie - ↘ fibrose rénale		H. Wu et al. 2016
		Souris KK-Ay + régime hyperlipidique (diabète + obésité modérée) Inhibition de miR-21a-5p (antagomir)	miR-21a-5p rein et sérum corrélés miR-21a-5p circulant ↗ associé à - albuminurie - fonction rénale altérée - lésions rénales glomérulaires <u>Inhibition miR-21a-5p :</u> amélioration des 3 paramètres ci-dessus	*HKC (Human Kidney Cells)* : **SMAD 7**	J. Wang et al. 2015
		Souris KK-Ay + régime hyperlipidique Inhibition de miR-21a-5p (lentivirus)	miR-21a-5p ↗ □□□□□total <u>Inhibition miR-21a-5p :</u> - ↘ des marqueurs de TEM, de fibrose - ↘ albuminurie	*HKC (Human Kidney Cells)* + TGF-ß: TGF-ß – SMAD 3 / **SMAD 7** α-SMA, E-cadhérine	J.-Y. Wang et al. 2014

Néphropathie diabétique (ND) (suite)	Délétère (suite)	Souris KK-Ay Inhibition de miR-21a-5p (oligonucléotide)	miR-21a-5p ↗ rein total associé à albuminurie, insuffisance rénale associé à sclérose glomérulaire <u>Inhibition miR-21a-5p</u> : ↘ lésions	**MMP9 –** TIMP1	Jinyang Wang et al. 2013
		Diabète induit par streptozotocine Souris TIMP3$^{-/-}$	miR-21a-5p ↗ total	*Cellules mésangiales (souris)* : **TIMP3** SirT1	Fiorentino et al. 2013
		Souris db/db Inhibition de miR-21a-5p (transfert de shARN (small hairpin ARN) inductible par Doxycycline)	miR-21a-5p ↗ total (glomérules et tubules) <u>inhibition de miR-21a-5p</u> : - amélioration fonction rénale - inhibition fibrose rénale et inflammation	*Cellules mésangiales et tubulaires (rat) :* **SMAD 7** - TGF-ß - NFκB	Zhong et al. 2013
		Souris OVE26 (diabète type 1)	miR-21a-5p ↗ cortex rénal	*Cellules mésangiales (rat et humain)*: **PTEN** – AKT – GSK3ß - Tor complex 1	Dey et al. 2012
		Souris NOD (Non Obese Diabetic) PDCD4$^{-/-}$ (diabète type 1)	miR-21a-5p ↗ ilôts ß	*Cellules ß (souris)* : **PDCD4** - NFκB	Ruan et al. 2011
Néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA	délétère			*Cellules mésangiales et podocytes (humain), HK-2* : **PTEN**- Akt	Bao et al. 2014
Syndrome d'Alport	délétère	Souris Col4a3 $^{-/-}$ Inhibition de miR-21a-5p (oligonucléotide)	miR-21a-5p ↗ rein total (glomérule et tubule) <u>Inhibition de miR-21a-5p</u> : Amélioration fonction rénale et protéinurie Augmentation de la survie ↘ fibrose glomérulaire et interstitielle	*Cellules tubulaires proximales, podocytes, fibroblastes (souris et humain) :* **PPAR-α** – RXR (Retinoid X Receptor)	Gomez et al. 2015

Glomérulo-néphrite	délétère	Rat injection de sérum néphrotoxique (modèle Ac anti-membrane basale glomérulaire)	miR-21a-5p urinaire ↗ après injection de néphrotoxique		Pavkovic et al. 2015
		Rat glomérulonéphrite induite par l'anti-Thy 1.1 (mod èle de lupus systémique)	miR-21a-5p ↗		Denby et al. 2011
				Lymphocyte T circulants (humain : patients lupiques) : **PDCD4**	Stagakis et al. 2011
PKRD	délétère	Souris Kif3a$^{-/-}$ Souris Pkd1$^{-/-}$ Souris Pkd2$^{-/-}$ Souris Hnf-1ß$^{-/-}$	miR-21a-5p ↗ rein total plutôt à la phase d'expansion des kystes KO miR-21a-5p : ↘ des kystes amélioration fonction rénale	*Cellules tubule collecteur (souris)* : **PDCD4**	Lakhia et al. 2015
Fibrose rénale /progression de la maladie rénale chronique	protecteur	Souris transgénique pour TGF-ß (modèle de sclérose glomérulaire) Inhibition miR-21a-5p (KO)	miR-21a-5p ↗ rein KO miR-21a-5p : ↗ protéinurie ↗ glomérulosclérose	*Podocytes (souris)* : **SMAD7** **PDCD4** **p53** **TIMP3**	Lai et al. 2015
	délétère	Souris néphropathie à l'adénine	↗ miR-21a-5p rein cortical		McClelland et al. 2015
		Souris Obstruction Urétérale Unilatérale (OUU)	↗ miR-21a-5p rein J4-J28	*Fibroblastes (souris)* : α-SMA, collagène 1A1	Glowacki et al. 2013
		Souris OUU Inhibition de miR-21a-5p (KO ou oligonucléotide)	↗ miR-21a-5p rein Inhibition de miR-21a-5p : Protection contre lésions de fibrose	*Myofibrobastes, cellules épithéliales rénales (souris)* : ERK/MAPK **PPARα** MPV17 **RECK**	Chau et al. 2012)

Fibrose rénale /progression de la maladie rénale chronique (suite)	Délétère (suite)	Souris OUU SMAD3$^{-/-}$ (protecteur) Inhibition miR-21a-5p (shRNA plasmide inductible par ultrasons)	↗ miR-21a-5p rein ↘ miR-21a-5p rein souris OUU □□□□□$^{-/-}$ <u>Inhibition de miR-21a-5p</u> : Amélioration des lésions histologiques		Zhong et al. 2011
		Souris OUU Inhibition miR-21a-5p (LNA)	↗ miR-21a-5p- rein <u>Inhibition de miR-21a-5p</u> : Amélioration des lésions histologiques		Zarjou et al. 2011
		Rat OUU Rat SHRSP (spontanément hypertendu)	miR-21a-5p ↗□□□□□		Denby et al. 2011

Abbréviations : AKI : Acute Kidney Injury ; EPO : erythropoïétine ; J : jour ; KO : Knock Out ; LNA : Locked Nucleic Acid ; ND néphropathie diabétique ; OUU : Obstruction Urétérale Unilatérale ; shRNA : small hairpin RNA, SHRSP : Spontaneously hypertensive rat stroke-prone.

l'inhibition de miR-21 concluent à un effet protecteur de l'inhibition de miR-21 (Zhong et al. 2013; Jinyang Wang et al. 2013; J.-Y. Wang et al. 2014; J. Wang et al. 2015; H. Wu et al. 2016). Le seul modèle montrant un effet délétère de l'inhibition de miR-21 diffère par deux éléments singuliers (Lai et al. 2015). Il s'agit, d'une part, du seul modèle utilisant des souris invalidées génétiquement et non pas basé sur l'administration d'un antagoniste de miR-21. D'autre part, le délai d'analyse est relativement court : 4 semaines après l'injection de streptozotocine *versus* 12 à 24 semaines dans le même modèle pour les autres travaux (Fiorentino et al. 2013; H. Wu et al. 2016) et 12 à 20 semaines dans d'autres modèles de néphropathie diabétique (Ruan et al. 2011; Nirmalya Dey et al. 2012; Zhong et al. 2013; Jinyang Wang et al. 2013; J.-Y. Wang et al. 2014; J. Wang et al. 2015, 201). Enfin, un seul travail a étudié la surexpression de miR-21, *via* l'administration d'un plasmide entre 4 et 8 semaines de vie concluant à un effet protecteur de miR-21 (Zheng Zhang et al. 2009). Le blocage très précoce de miR-21, avant le début des manifestations cliniques dans ce modèle, ainsi que l'analyse précoce pourraient expliquer ces résultats discordants. Ainsi, à la phase précoce de la néphropathie diabétique (hypertrophie mésangiale), la surexpression de miR-21 semble avoir un effet préventif contre les lésions rénales et l'utilisation d'antagonistes de miR-21 ne semble alors pas bénéfique. *A contrario*, la surexpression de miR-21 à la phase d'état de la néphropathie diabétique (glomérulosclérose et fibrose interstitielle) a des conséquences délétères et son inhibition à ce stade pourrait permettre une amélioration des lésions.

Ces exemples illustrent la complexité du rôle de miR-21 au cours des agressions rénales. Ils sont en faveur d'un rôle protecteur de miR-21 à la phase initiale d'une agression (en particulier dans le pré-conditionnement) protégeant de lésions rénales ultérieures, mais délétère dans la chronicité. L'exploration des mécanismes moléculaires sous-jacents, et en particulier des cibles de miR-21, pourrait permettre d'améliorer la compréhension du role ambivalent de miR-21.

4) Cibles de miR-21

a. *Techniques d'analyse des cibles de miR-21*

i. *Techniques in silico*

Des outils bio-informatiques ont été développés depuis plus d'une dizaine d'années afin d'améliorer la prédiction des cibles des miARN. Le premier travail mettant en relation la séquence de miARN conservés entre les espèces et la région 3'UTR d'ARN messagers (Lewis et al. 2003) a permis de générer l'outil TargetScan, actuellement très largement utilisé. Ce type d'outil a été perfectionné grâce à l'amélioration des connaissances acquises sur les miARN en particulier :

- l'importance des nucléotides 2 à 7 dans la reconnaissance de la cible (Lewis et al. 2003),

- les variations d'affinité liées à la position et l'environnement de la séquence « seed » entrainant un effet répresseur (nucléotides A et U entourant la séquence seed) ou activateur (région 3'UTR, distance minimum de 15 nucléotides après le codon stop, caractère excentré pour les régions UTR longues, proximité d'un autre site cible des miARN) (Grimson et al. 2007),

- l'évaluation du degré de conservation de sites potentiels de liaison de miARN (R. C. Friedman et al. 2008),

- la stabilité thermodynamique du complexe miARN/ARNm (John et al. 2004).

Il existe actuellement près d'une dizaine de programmes permettant la prédiction de gènes cibles utilisant de façon variable les critères évoqués ci-dessus (DIANA-microT, miRanda, miRBase, miRBridge, PicTar, PITA, rna22 ElMMo, Targetscann 5.0). Toutefois, le pouvoir prédictif de ces algorithmes reste modéré. En effet, l'acuité de prédiction (nombre de prédictions correctes / nombre de prédictions totales) varie de 24% à 58% (Alexiou et al. 2009). En fonction de l'outil de prédiction utilisé, le nombre de cibles potentielles de miR-21 est également variable et est compris entre 240 et 8897 cibles. Ainsi, ces méthodes *in silico* permettent de définir des pistes pour l'exploration des cibles des miARN. Il reste par la suite nécessaire de valider expérimentalement la fonctionnalité des interactions miARN-ARNm prédites.

ii. Outils expérimentaux

✓ *Modification des transcrits et protéines*

La première étape consiste à confirmer que la quantité de l'ARNm (et/ou de la protéine) supposé cible est dépendante de la modulation du miARN. Pour une cible donnée, la quantification se fait classiquement par PCR quantitative et/ou Western Blot. Les techniques de micropuce à ARN et de pSILAC (pulsed Stable Isotope Labellingwith Aminoacids in Cell culture) permettent d'analyser les profils complets des ARNm et protéines (Ong et al. 2002). Ces méthodes sont limitées par, d'une part, la nécessité de recourir à des inhibiteurs ou des analogues des miARN d'intérêt, s'éloignant ainsi des conditions rencontrées *in vivo*, et d'autre part l'absence de lien de causalité directe.

✓ *Méthode directe*

Le « gold-standard » pour valider une cible de miARN est l'utilisation d'un gène rapporteur couplé à la luciférase. La modulation de l'expression du gène cible secondairement à la variation de quantité (surexpression ou inhibition) du miARN signe leur interaction. Des expériences de mutagenèse dirigée de la séquence « seed » permet de confirmer de façon robuste l'interaction miARN-ARNm. Cette technique nécessite également des modifications supra-physiologiques du miARN d'intérêt, ne reflétant probablement pas les situations *in vivo*.

✓ *HITS-CLIP (méthode semi-directe)*

L'identification de cibles de miARN sans aucune modification des niveaux de miARN ou d'ARNm est possible en utilisant la technique du HITS-CLIP (HIgh-Throughput Sequencing of RNAs isolated by CrossLinking ImmunoPrecipitation) (Chi et al. 2009; Moore et al. 2014). Cette technique est détaillée dans la Figure 9. Brièvement, après liaison des ARN aux protéines (rayons UV), une immunoprécipitation utilisant un anticorps spécifique dirigé contre AGO est réalisée. Les complexes ARN-protéines sont séparés par électrophorèse, puis une digestion protéique permet la dissociation des ARN. Les ARNm et miARN sont ensuite identifiés par des méthodes à haut débit. La dernière étape consiste à apparier les ARNm avec leur miARN selon les complémentarités de séquence. Cette technique, ne permet pas de valider formellement une interaction, dans la mesure où l'analyse des ARNm et des miARN reste dissociée.

Elle a l'avantage d'être une méthode semi-directe et d'étudier les interactions en conditions physiologiques.

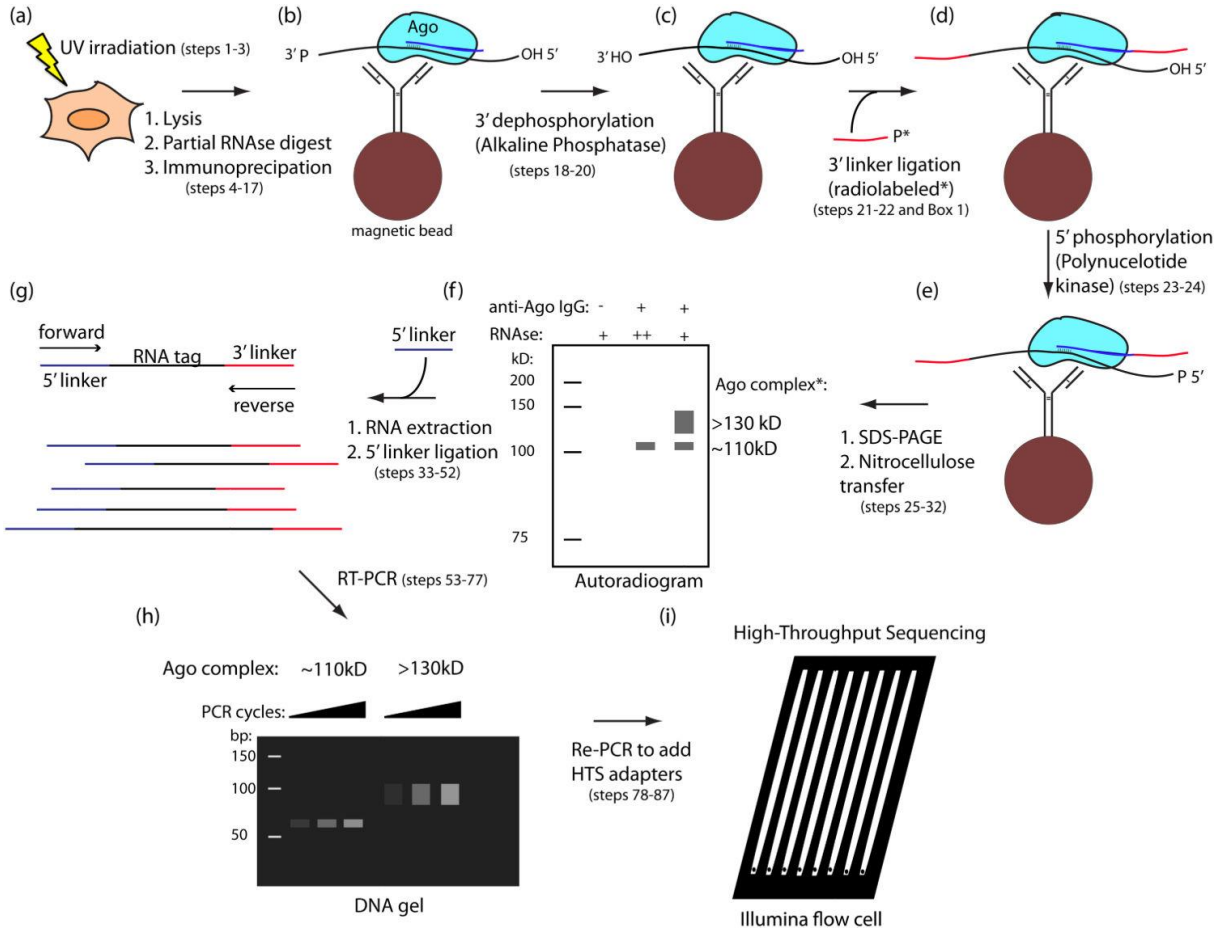


Figure 9 : Vue d'ensemble de la technique de HITS-CLIP (HIgh - Throughput Sequencing of RNAs isolated by CrossLinking ImmunoPrecipitation). Le miARN est représenté en bleu, l'ARNm en noir. (a) L'irradiation UV de cellules vivantes ou de tissus permet la liaison ARN-protéine.
(b) Le matériel est lysé, l'ARN partiellement digéré, puis Ago est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps couplé à des billes magnétiques. (c) Le traitement par la phosphatase alcaline élimine l'hydroxyle en3 '. (d) Un ligand radiomarqué (*) représenté en rouge est ajouté en 3 '. (e) Une kinasepolynucleotide phosphoryle l'extrémité 5 '. (f) Les complexes sont élués et séparés sur SDS-PAGE. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, les complexes sont visualisés par autoradiographie. (g) Une digestion protéique permet de libérer l'ARN dans les régions de migration d'intérêt. Un ligand est ajouté en 5', représenté en violet. (h) Les brins sont amplifiés par RT-PCR avec les amorces correspondant aux ligands en 3' et 5'. (i) Après addition des adaptateurs dédiés, les ADNc sont analysés par séquençage à haut débit. D'après Moore et al. 2014.

b. *Cibles de miR-21*

Seules les cibles de miR-21 confirmées par l'utilisation d'un système rapporteur sont détaillées dans ce chapitre.

Les cibles de miR-21 sont impliquées dans de nombreux mécanismes et voies de signalisation jouant un rôle au cours de la réponse rénale à une agression, notamment la prolifération cellulaire (PTEN), l'apoptose (PDCD4, Bcl2), la régulation du métabolisme cellulaire (PPAR-α, PHD2), l'inflammation (MKK3), la régulation des constituants de la matrice extra-cellulaire (Reck, TIMP3), la voie du TGF-ß (Transforming Growth Factor-ß) (SMAD7), l'angiogenèse (Reck, THSP-1, PHD2) et l'autophagie (Rab11a).

i. *Phosphatase and TENsin homologue (PTEN)*

L'interaction de miR-21 avec PTEN a été validée dans des cellules mésangiales murines et humaines (N. Dey et al. 2011) et dans des fibroblastes humains provenant de cicatrices hypertrophiques (Zhu et al. 2014). PTEN est une protéine physiologique cruciale. En effet, PTEN régule notamment de multiples processus cellulaires tels que la survie, la prolifération, le métabolisme énergétique et l'architecture cellulaire (Figure 10). Son activité phosphatase s'oppose à l'action de PI3K et entraine une inhibition de la voie Akt – mTor impliquée dans la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaires (Song, Salmena, and Pandolfi 2012). Indépendamment de son activité phosphatase, PTEN joue également un rôle intra-nucléaire de stabilisation génomique et de contrôle de la progression du cycle cellulaire (Song, Salmena, and Pandolfi 2012).

L'expression de PTEN est diminuée dans les glomérules et l'interstitium de patients porteurs d'une néphropathie à IgA (Bao et al. 2014). L'inhibition de PTEN par miR-21 a été montrée dans des modèles murins d'ischémie-reperfusion et de diabète. Les conséquences de l'interaction miR-21-PTEN explorées *in vitro* sont l'objet de publications plus contradictoires. L'inhibition de PTEN par miR-21 pourrait être à l'origine d'un effet bénéfique en favorisant la prolifération des cellules tubulaires au cours de l'ischémie-reperfusion (Jia, Teng, Zou, Fang, Zhang, et al. 2013; W. Zhang and Shu 2016) et en inhibant la prolifération de cellules mésangiales soumises à une hyperglycémie (Zheng Zhang et al. 2009). Des données contradictoires montrent que PTEN favoriserait la prolifération mésangiale au cours du diabète (Kato, Arce, and

Natarajan 2009; Mahimainathan et al. 2006; Nirmalya Dey et al. 2012). D'autres travaux montrent un effet délétère de l'inhibition de PTEN par miR-21 *via* l'induction d'un phénotype mésenchymateux et profibrotique dans les cellules tubulaires dans un modèle de toxicité de la ciclosporine (J. Chen et al. 2015) et dans les podocytes et cellules tubulaires dans un modèle *in vitro* de néphropathie à IgA (Bao et al. 2014).

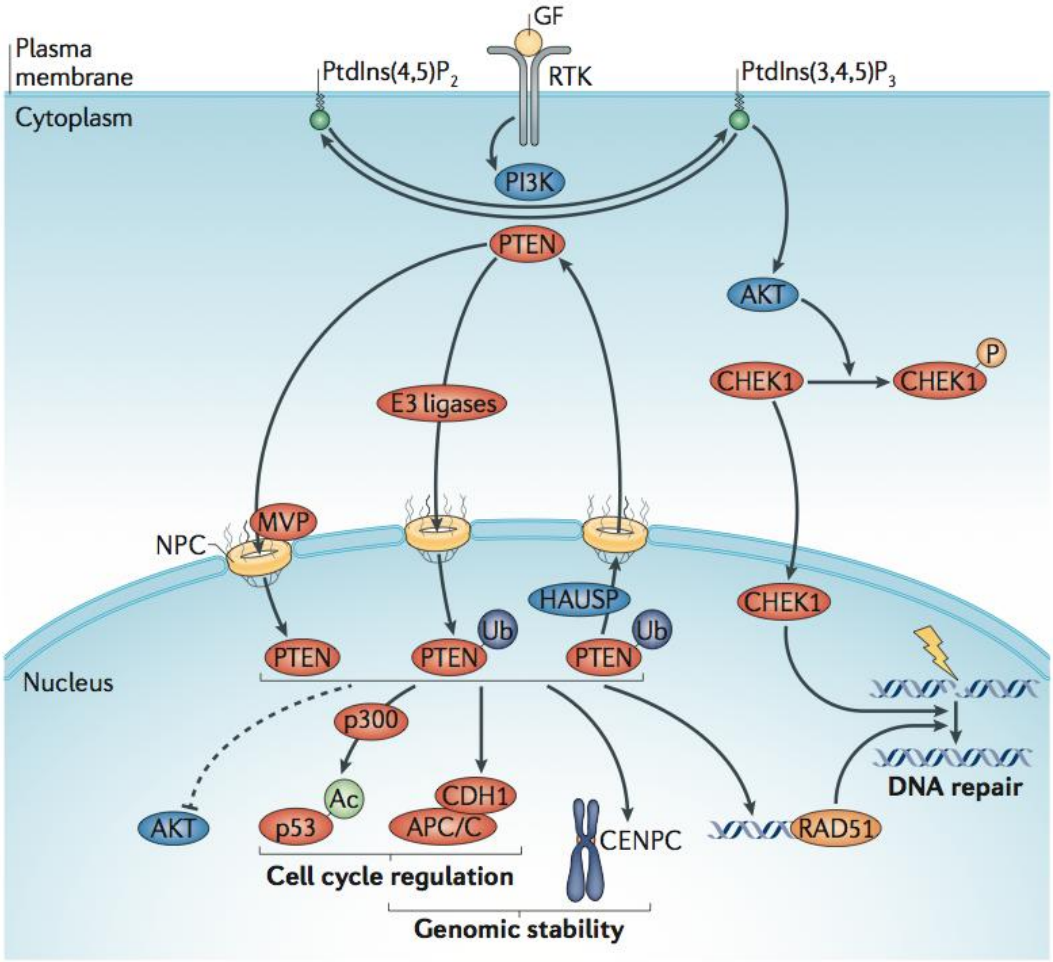


Figure 10 : Fonctions générales de PTEN. Après translocation dans le noyau, PTEN contrôle la prolifération cellulaire *via* p300 – p53 et APC/C (Anaphase-Promoting Complex ou Cyclosome). Il favorise également la stabilité génomique et la réparation de l'ADN. PTEN inhibe également la voie Akt. Abréviations : Ac (acetylation), CDH1 (CDC20 homologue 1), CENPC (centromere protein C), GF (growth factor), MVP (major vault protein), NPC (nuclear pore complex), P (phosphorylation), PI3K (phosphoinositide 3-kinase), PtdIns(3,4,5)P3 (phosphatidylinositol- 3,4,5-trisphosphate), RTK (receptor Tyr kinase); Ub, ubiquitylation. D'après Song, Salmena, and Pandolfi 2012.

ii. Programmed Cell Death protein 4 (PDCD4)

L'inhibition de PDCD4 par miR-21 a été montrée dans de multiples types cellulaires, en particulier dans des cellules HEK293 (Human Embryo Kidney) (Cheng et al. 2010).

PDCD4 est un suppresseur de tumeur impliqué dans différents processus cellulaires (Lankat-Buttgereit and Göke 2009). Sa localisation sub-cellulaire est principalement nucléaire, mais PDCD4 peut se transloquer dans le cytoplasme secondairement à une phosphorylation par la protéine Akt (Palamarchuk 2005). Il est fortement augmenté dans les situations d'apoptose (Young, Yang, and Colburn 2003), induit un arrêt du cycle cellulaire et inhibe l'invasion cellulaire (G. Wang et al. 2015) (Figure 11A). Il agit conne un régulateur du transcriptome des cellules, notamment *via* les facteurs de transcription c-Jun, Sp1 et p53 (Lankat-Buttgereit and Göke 2009), mais

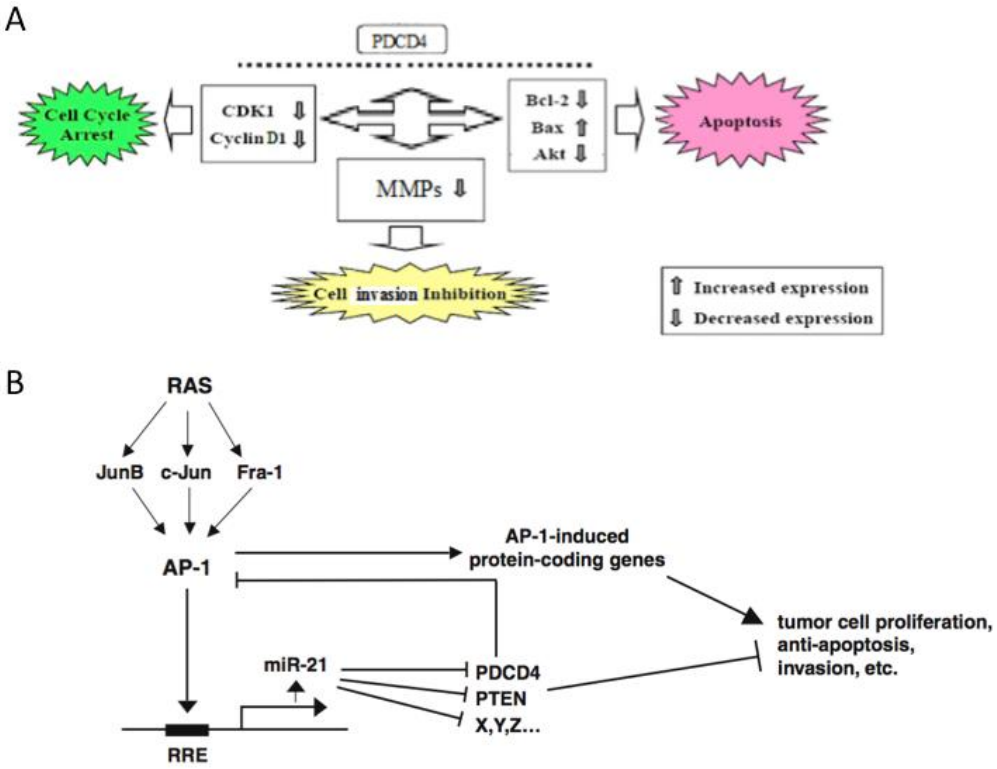


Figure 11 : Régulation et cibles de PDCD4. A : PDCD4 régule l'apoptose, la progression du cycle cellulaire et l'invasion cellulaire en ciblant des facteurs de transcription variés, tels c-Jun, Sp1 et p53 B : PDCD4 est impliqué dans une boucle de régulation négative avec miR-21 par l'intermédiaire du facteur de transcription AP1. MMP : Matrix MetalloProtease ; RRE : Ras Responsive Enhancer, STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3 D'après G.Wang et al. 2015 et Talotta et al. 2009.

aussi en inhibant l'Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A, un composant du complexe d'initiation de la transcription (H.-S. Yang et al. 2003). Par ailleurs, PDCD4 participe à une boucle de régulation négative de miR-21 car il inhibe la transactivation de AP-1, un promoteur de la transcription de miR-21 (Figure 11B) (Talotta et al. 2009).

In vitro, la régulation de PDCD4 par miR-21 est associé à la prolifération cellulaire dans un modèle de culture primaire de cellules tubulaires rénales soumises à un milieu hypoxique (Godwin et al. 2010). L'inhibition de PDCD4 par miR-21 est associée à l' apoptose accrue de podocytes en culture (Lai et al. 2015). L'implication de l'interaction miR-21–PDCD4 au cours des néphropathies a été explorée *in vivo* dans des modèles murins d'ischémie-reperfusion. Dans ce modèle, l'administration d'un préconditionnement protecteur par le xenon entraine une diminution de l'expression de miR-21 associée à l'augmentation de l'expression de PDCD4 (Jia, Teng, Zou, Fang, Zhang, et al. 2013). L'augmentation de l'expression de PDCD4 induite par l'inhibition de miR-21 chez des souris soumises à de l'ischémie-reperfusion est associée une apoptose accrue des cellules tubulaires (Xialian Xu et al. 2012). De plus, dans un modèle murin de polykystose rénale, l'inhibition de miR-21 entraine un ralentissement de la croissance des kystes en activant l'apoptose des cellules kystiques *via* la levée d'inhibition sur PDCD4 (Lakhia et al. 2015).

iii. B-Cell Lymphoma-2 (BCL2)

L'ARNm de Bcl2 est une cible confirmée de miR-21 dans plusieurs modèles cellulaires, en particulier les lignées HEK293 (Z. Wu et al. 2012) et MIA PaCa-2 (une lignée de cancer pancréatique) (Dong et al. 2011). Bcl2 est une protéine anti-apoptotique, capable d'inhiber en particulier les protéines pro-apoptotiques effectrices BAX et BAK (Figure 12) (Czabotar et al. 2013). Toutefois, les données disponibles dans le rein sont assez paradoxales. En effet, dans un modèle d'ischémie–reperfusion chez le rat, la ghréline a un effet protecteur anti-apoptotique et anti-inflammatoire vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion et induit une augmentation de miR-21. Cependant, alors que Bcl2 est une cible directe de miR-21, son expression augmente avec l'expression de miR-21 induite par la ghréline (W. Zhang and Shu 2016). Ce résultat paradoxal illustre la

complexité des interactions de miR-21 avec ses cibles et suggère l'activation d'une voie de signalisation alternative dans cette situation.

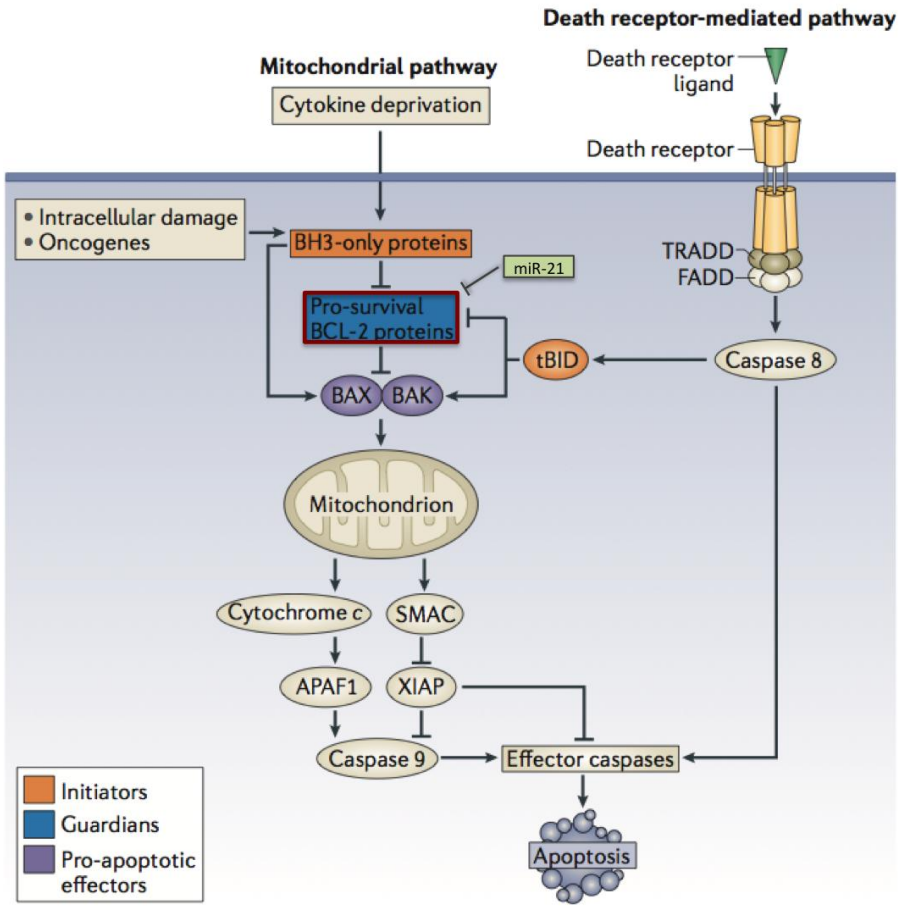


Figure 12 : Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose : rôle des protéines Bcl2 inhibitrices de l'apoptose. Différents stimulus peuvent déclencher les voies de l'apoptose en activant les facteurs pro-apoptotiques BAX et BAK, et en activant indirectement par la voie mitochondriale intrinsèque, ou directement par la voie extrinsèque des récepteurs de mort. Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs négatifs de l'activation de la voie intrinsèque par l'inhibition de Bax et Bak. Abréviations : APAF1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1), FADD (FAS-Associated Death Domain), SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases), TRADD (TNFR-Associated Death Domain), XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein). D'après Czabotar et al. 2013.

iv. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR-α)

Deux équipes ont démontré la modulation de l'expression de PPAR-α par miR-21 dans des cellules endothéliales (J. Zhou et al. 2011) et des cellules de glioblastome (K. Zhang et al. 2014). Zhou *et al* ont de plus identifié que deux sites fonctionnels de fixation pour miR-21 sont présents sur la séquence du gène PPAR-α dans des cellules

endothéliales (J. Zhou et al. 2011). PPAR-α est un récepteur nucléaire fonctionnel lorsqu'il

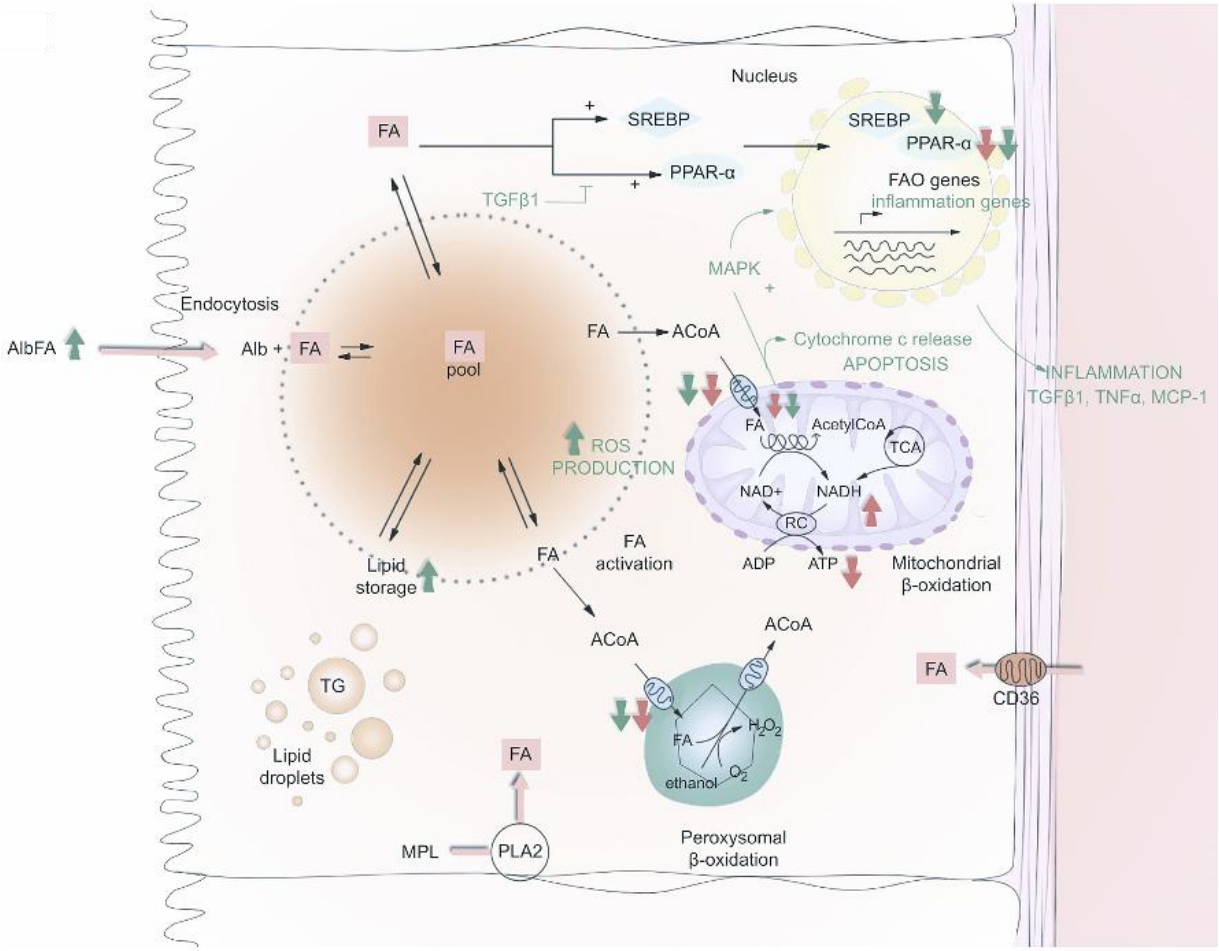


Figure 13 : Métabolisme des acides gras en situation rénale pathologique. L'accumulation d'acides gras en situation pathologique est secondaire à un excès d'endocytose des acides gras ou un défaut de métabolisme. La diminution de PPAR-α et de SREBP1c induit une diminution de la transcription des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et une transcription accrue de gènes de l'inflammation. Les flèches rouges ou vertes indiquent les modifications induites respectivement au cours d'une agression rénale aiguë ou de la fibrose. FA, fatty acid; CoA, CoenzymeA; ACoA, acyl-CoenzymeA; Alb, albumin; SREBP, sterol regulatory element-binding protein-1c; PPAR-α, peroxisome proliferator activated receptor-alpha; MAPK, mitogen-activated protein kinase; FAO, fatty acid oxidation; MPL, membrane phospholipid; ROS, reactive oxygen species; NAD, nicotine adenosine dinucleotide; RC, respiratory chain; PLA2, phospholipase A2; TG, triglyceride; TGF-β1, transforming growth factor β1; ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; TNF α, tumor necrosis factor α; MCP-1, monocyte chemo-attractant protein-1. D'après Simon and Hertig 2015.

est présent sous forme d'hétérodimère en association avec le Retinoid X Receptor. Il participe à la régulation du métabolisme lipidique en induisant la transcription de facteurs impliqués dans l'oxydation des acides gras (Simon and Hertig 2015), en

particulier l'acétyl-CoA oxydase dans le peroxisome et la Carnitine palmitoyltransferase I dans les mitochondries (Finck et al. 2002) (Figure 13). Une déplétion en acides gras oxydés entraine une situation de carence métabolique pour la cellule tubulaire proximale et pourrait participer à la perte d'un phénotype différencié *via* l'augmentation de Snail, un régulateur majeur de la transition épithélio-mésenchymateuse (Simon and Hertig 2015). D'autre part, l'accumulation des acides gras se traduit par l'augmentation de l'apoptose et la production de cytokines pro-inflammatoires (Simon and Hertig 2015). L'inhibition de miR-21 *in vitro* dans des cellules murines épithéliales rénales (Chau et al. 2012; Gomez et al. 2015) ou des podocytes (Gomez et al. 2015) exposés au TGF-ß conduit à la réversibilté du phénotype induit par le TGF-ß mais également à la levée de la répression de PPAR-α.

Dans un modèle murin d'obstruction urétérale unilatérale, l'expression rénale de PPAR-α est diminuée. L'inhibition de miR-21 restaure l'expression de PPAR-α et permet de réduire les lésions de fibrose rénale. A l'inverse, l'inhibition de miR-21 n'a pas d'effet si les souris sont invalidées pour PPAR-α, traduisant l'importance de cette voie dans la fibrose rénale médiée par miR-21 (Chau et al. 2012). De plus, dans un modèle murin de syndrome d'Alport (souris *Col4a3*$^{-/-}$), l'analyse transcriptomique des reins lésés confirme la dérégulation des voies peroxisomale et mitochondriale du métabolisme des acides gras. Le traitement par un antagoniste de miR-21 restaure ces anomalies métaboliques (Gomez et al. 2015). L'ensemble de ces données semble concordant sur le rôle de l'interaction du métabolisme lipidique via PPAR-α dans les phénomènes de fibrose rénale favorisée par miR-21.

v. Prolyl Hydroxylase Domain (PHD2)

PHD2 est une cible de miR-21 validée expérimentalement dans des cellules HeLa (lignée cancéreuse humaine) et des cellules HK-2 (cellules tubulaires humaines) (Jiao et al. 2016). HIF-1 (Hypoxic Inducible Factor-1) est une protéine centrale dans la réponse rénale à l'hypoxie, en induisant différentes voies d'adaptation comme l'angiogenèse (*via* le VEGF), la stimulation de la synthèse d'érythropoïétine ou la diminution de la consommation énergétique de la cellule (Kaelin and Ratcliffe 2008). En condition normoxique, la famille des enzymes Prolyl Hydroxylase Domain, codées par les gènes *EGLN*, catalyse l'hydroxylation de HIF-1α, entrainant par la suite sa dégradation par

ubiquitination (Appelhoff et al. 2004). L'isoforme PHD2 régule négativement l'expression des gènes cibles induits par l'hypoxie (Figure 14).

L'augmentation de HIF-1α induite par un pré-conditionnement ischémique ou par inhibition de PHD2 est protectrice au cours de l'ischémie-reperfusion (Bernhardt 2006; Z. Cai et al. 2007; Kapitsinou et al. 2012; Xialian Xu et al. 2012). Dans ce contexte, l'inhibition de miR-21 chez des souris soumises à de l'ischémie-reperfusion fait perdre le bénéfice du pré-conditionnement ischémique en augmentant PHD2 et diminuant HIF-1α et VEGF (Jiao et al. 2016).

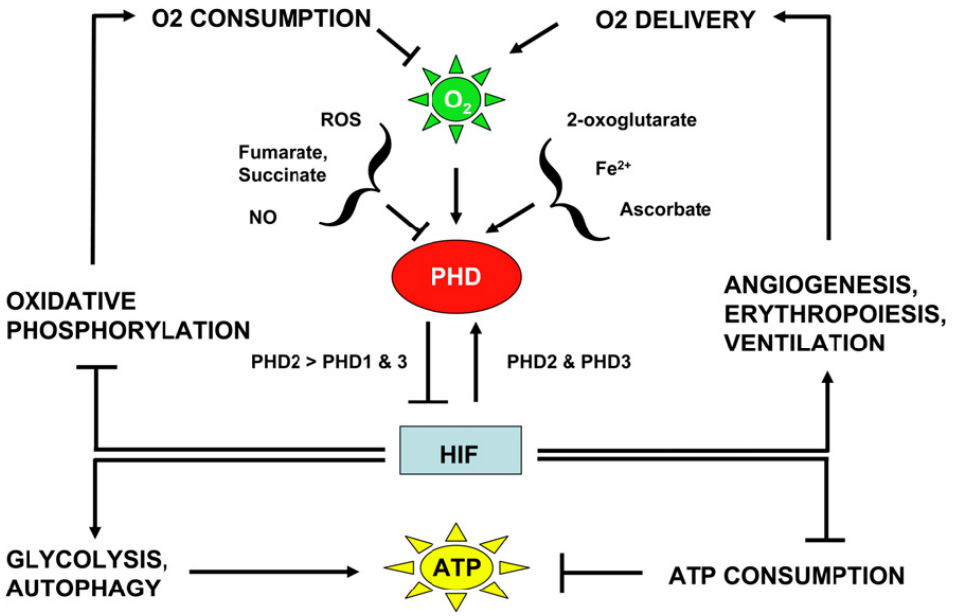


Figure 14 : Rôle des enzymes PHD dans la régulation des facteurs de transcription induits par HIF en réponse à l'hypoxie. Abbréviations : ATP : Adénosine TriPhosphate ; NO : Nitric Oxyd ; PHD : Prolyl Hydroxylase Domain; ROS : Reactive Oxydgen Species. D'après Kaelin and Ratcliffe 2008.

vi. Mitogen Activated Protein Kinase-Kinase 3 (MKK3)

L'interaction directe de miR-21 avec MKK3 a été montrée dans les lignées HepG2 (carcinome hépatique humain) (G. Xu et al. 2013) et HEK293 (cellules rénales embryonnaires) (Li et al. 2016b). MKK3 est un activateur universel de la voie de signalisation MAPK – p38 (R. J. Davis 1994), impliquée de façon ubiquitaire dans de nombreux processus cellulaires, tels l'apoptose et l'inflammation (Figure 15). Cette voie intervient en particulier dans les processus apoptotique et inflammatoire des cellules

rénales dans un modèle murin d'obstruction urétérale unilatérale (F. Y. Ma et al. 2007), mais également dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion (K. M. Park et al. 2002).

Ainsi, le préconditionnement ischémique entraine une augmentation précoce de l'expression rénale de miR-21, une diminution de l'activation de la voie MKK3 – MAPK – p38, entrainant ainsi la diminution de cytokines inflammatoires d'aval (TNF-α (Tumor Necrosis Factor α), IL-6) (Li et al. 2016b). L'induction préalable de miR-21 pourrait ainsi diminuer la réponse inflammatoire à des lésions ischémiques.

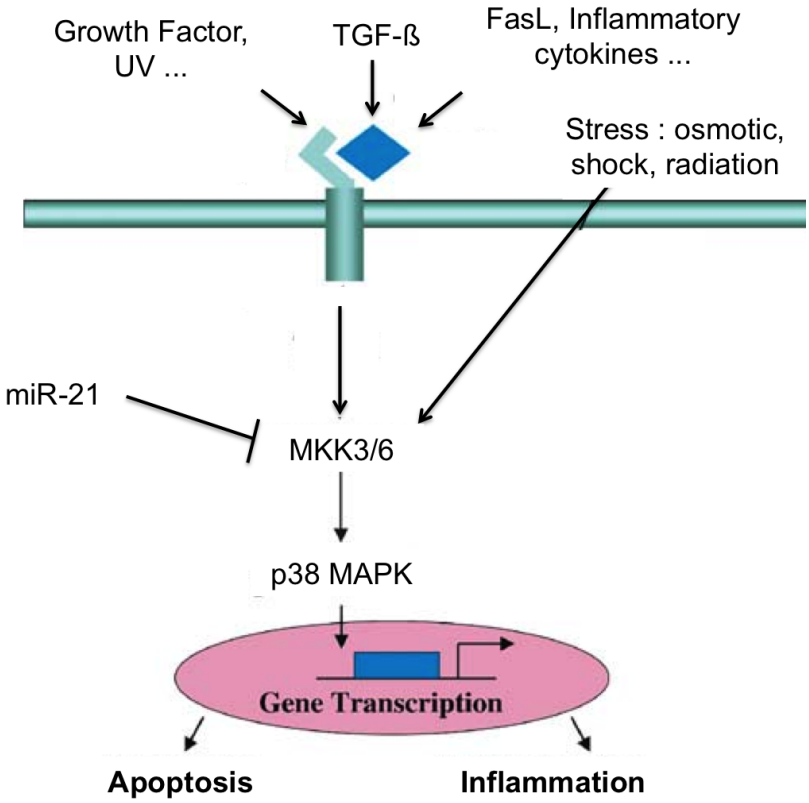


Figure 15 : Activation de la voie de signalisation p38 – MAPK. FasL : FAS Lingand ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; MMK3/6 : Mitogen Activated Protein Kinase-Kinase; TFG-ß : Transforming Growth Factore ß ; UV : Ultra violet. D'après Pelaia et al. 2005.

vii. REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK)

L'interaction de miR-21 avec sa cible Reck a été confirmée dans plusieurs modèles cellulaires de tumeurs, notamment de carcinome hépato-cellulaire (L. Zhou et al. 2013) et de cancer gastrique (Zhiyu Zhang et al. 2008). RECK est une glycoprotéine membranaire ubiquitaire qui joue un rôle dans le remodelage tissulaire, notamment en

inhibant les métalloprotéases (Figure 16) (Alexius-Lindgren et al. 2014). Si les métalloprotéases sont bénéfiques à un stade précoce d'une agression rénale, elles deviennent par la suite délétères en favorisant la migration et l'invasion, notamment de cellules pro-fibrotiques. De plus, il existe une corrélation significative entre l'expression du gène RECK et la néoangiogenèse, vraisemblablement *via* la médiation du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Takenaka et al. 2004).

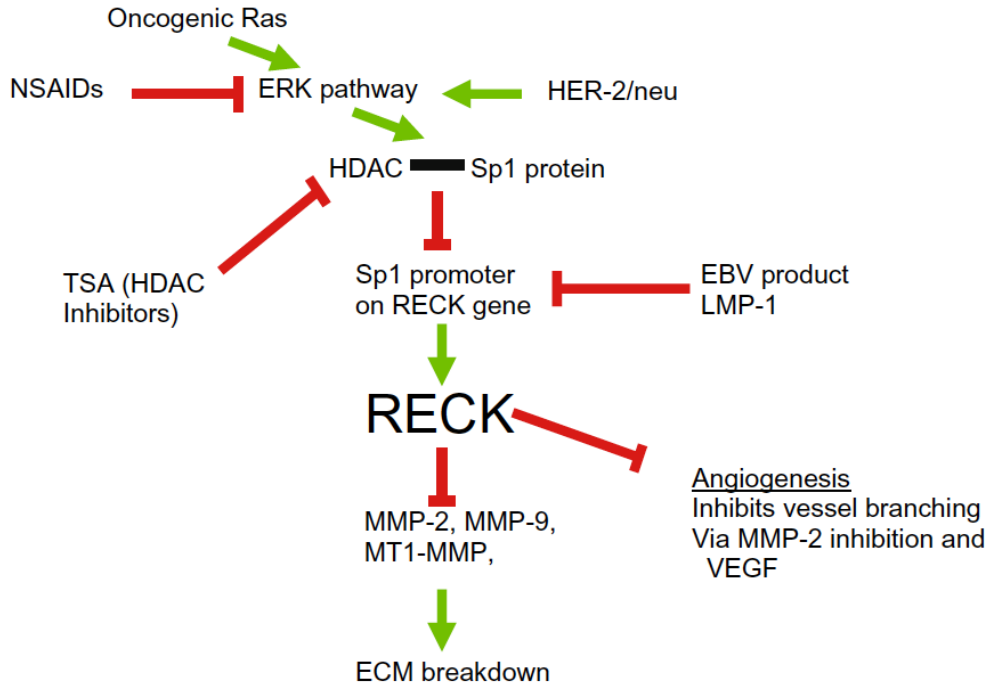


Figure 16 : Voies de signalisation impliquant RECK. Le promoteur SP1 de RECK est inhibé par le complexe HDAC-Sp1. RECK influence le remodelage tissulaire *via* l'inhibition des métalloprotéases et l'inhibition de l'angiogenèse. HDAC: Histone deacetylase; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; MMP Matrix metalloproteinase; MT1: Metallothionein-1; VEGF: Vascular endothelial growth factor. D'après Clark et al. 2007.

RECK est exprimé dans les cellules épithéliales rénales de rein de souris sain ou soumis à une obstruction urétérale unilatérale. Après obstruction urétérale unilatérale, RECK est surexprimé et entraine une diminution de l'activité métalloprotéase dans le rein. miR-21 freine cette surexpression limitant les effets bénéfiques de RECK (Chau et al. 2012). *In vitro*, on observe également une restauration de l'expression de RECK suite à l'inhibition de miR-21 dans des cultures primaires de cellules épithéliales placées dans un milieu hypoxique ou exposées au TGF-ß (Chau et al. 2012).

viii. Tissue Inhibitors of MetalloProteinase 3 (TIMP3)

TIMP3 est une cible directe de miR-21, mise en évidence dans des modèles cellulaires de carcinome rénal (A. Zhang et al. 2011) et de carcinome oesophagien (N. Wang et al. 2013). TIMP3 est probablement lié à la membrane par une glycoprotéine héparane sulfate. Cette protéine est un inhibiteur de certaines métalloprotéases membraines ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) ou liées à la membrane ADAM-TS ((A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs), impliquées dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire (Figure 17) (Baker, Edwards, and Murphy 2002).

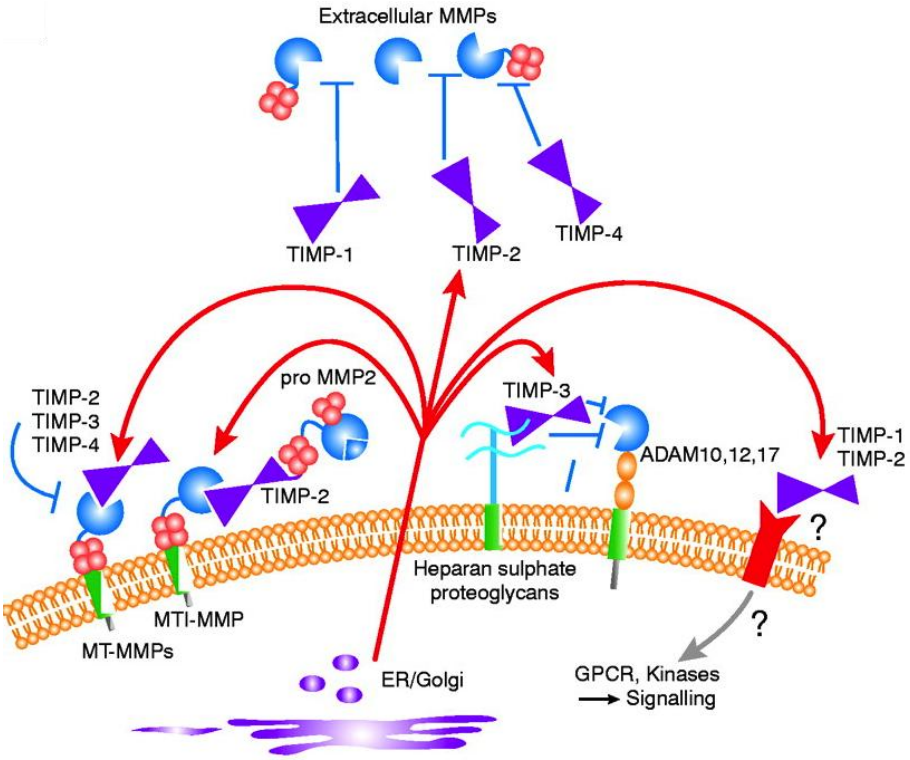


Figure 17 : Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) dans l'environnement péricellulaire. Les protéines TIMP (1 à 4) régulent l'activité des MMP (Matrix Metallopeotéases) solubles, liées à des protéines de la matrice ou à la membrane. TIMP-3 est liée à la membrane cellulaire par une héparane sulfate, elle inihibe certaines protéines ADAM (A Desintegrin And Metalloprotease) et ADAM-TS (ADAM with ThromboSpondine). D'après Andrew H. Baker, Edwards, and Murphy 2002.

Il s'agit de la protéine TIMP la plus fortement exprimée dans le rein et dont l'implication dans de nombreuses néphropathies a été démontrée (Fiorentino et al. 2013). L'expression de TIMP3 est augmentée dans les reins de souris surexprimant le TGF-ß et invalidées pour miR-21 (Lai et al. 2015). De même, dans le tissu rénal de souris

diabétiques, TIMP3 est inversement corrélé à l'expression de miR-21 (Fiorentino et al. 2013). *In vitro*, cette levée d'inhibition est également observée suite à la neutralisation de miR-21 dans des cultures podocytaires (Lai et al. 2015) et des cultures de cellules mésangiales (Fiorentino et al. 2013).

ix. SMAD 7

La liaison de miR-21 à SMAD 7 a été mise en évidence à deux reprises dans des cellules tubulaires humaines (J.-Y. Wang et al. 2014; Zhong et al. 2013). SMAD 7 est une protéine inhibitrice de la voie du TGF-ß, une cytokine largement impliquée dans la fibrose rénale. En pathologie rénale, l'inhibition de SMAD 7 conduit à l'augmentation de la voie TGF-ß SMAD3, entrainant une surexpression de marqueurs de fibrose (en particulier le collagène) et de transition épithélio-mésenchymateuse (Yanhua Zhang et al. 2015) (Figure 18). De plus, l'inhibition de SMAD 7 pourrait également avoir un effet pro-inflammatoire, par levée de l'inhibition de l'expression de NFκB, ainsi qu'un effet pro-apoptotique (Yanhua Zhang et al. 2015).

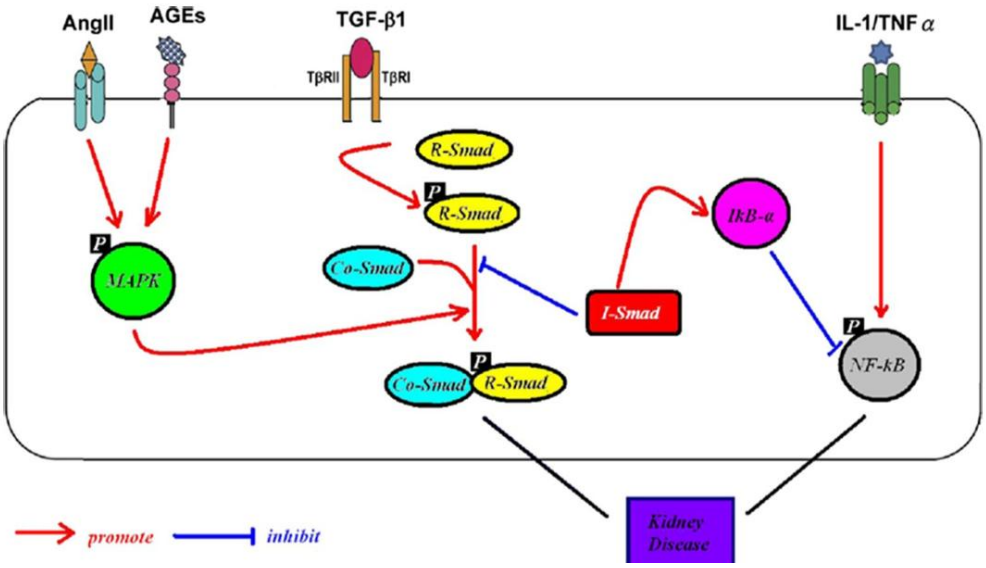


Figure 18 : Voie du TGF-ß au cours des maladies rénales. L'interaction du TGF-ß1 avec son récepteur phosphoryle les Smad effectrices (R-Smad) Smad 2 et 3. Les R-Smad se complexent à Smad4, co-effectrice, puis sont transloquées dans le noyau afin d'y moduler la transcription des gènes cibles. Les Smad inhibitrices 6 et 7 (i-Smad) inhibent l'association R-Smad-Co-Smad mais activent également le IκBα, permettant une inhibition directe de la voie NfκB. D'après Yanhua Zhang et al. 2015.

L'inhibition de miR-21 entraine une augmentation de l'expression tissulaire de SMAD7 dans un modèle murin transgénique TGF-ß 1 développant des lésions de fibrose rénale (Lai et al. 2015) et dans des souris diabétiques db/db (Zhong et al. 2013). *In vitro*, l'inhibition de miR-21 dans des conditions de stress cellulaire conduit à l'augmentation de l'expression de SMAD 7 avec des conséquences bénéfiques. Ainsi, dans des podocytes exposés au TGF-ß, l'inhibition de miR-21 restaure l'expression de SMAD 7 (Lai et al. 2015), connu pour inhiber l'apoptose podocytaire (Schiffer et al. 2001). La même observation a été faite dans des cellules tubulaires (Zhong et al. 2013; J.-Y. Wang et al. 2014) et mésangiales (Zhong et al. 2013) en milieu hyperglycémique (Zhong et al. 2013) ou exposées au TGF-ß (J.-Y. Wang et al. 2014), avec pour conséquence la diminution de marqueurs de fibrose (collagène I, fibronectine) (Zhong et al. 2013) et de marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse (α-SMA (α-Smooth Muscle Actin), E-cadhérine) (J.-Y. Wang et al. 2014).

x. Thombospondine-1 (THSP-1)

L'interaction de miR-21 avec la thrombospondine-1 (THSP-1) a été validée expérimentalement dans des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (Xialian Xu et al. 2016). THSP-1 est une glycoprotéine multifonctionnelle homotrimérique impliquée dans l'inflammation, l'apoptose et l'inhibition de l'angiogenèse au cours d'une lésion rénale (Figure 19) (Hugo and Daniel 2009; Lawler and Lawler 2012).

L'inhibition de miR-21 lors d'un préconditionnement protecteur avant des lésions d'ischémie-reperfusion abolit l'effet protecteur sur les lésions histologiques et la fonction rénale. Cet effet délétère de l'inhibition de miR-21 pourrait être secondaire à un défaut d'angiogenèse *via* la levée de l'inhibtion de THSP-1. En effet, l'expression rénale de THSP-1 augmente de façon parallèle au déficit de microvascularisation (Xialian Xu et al. 2016).

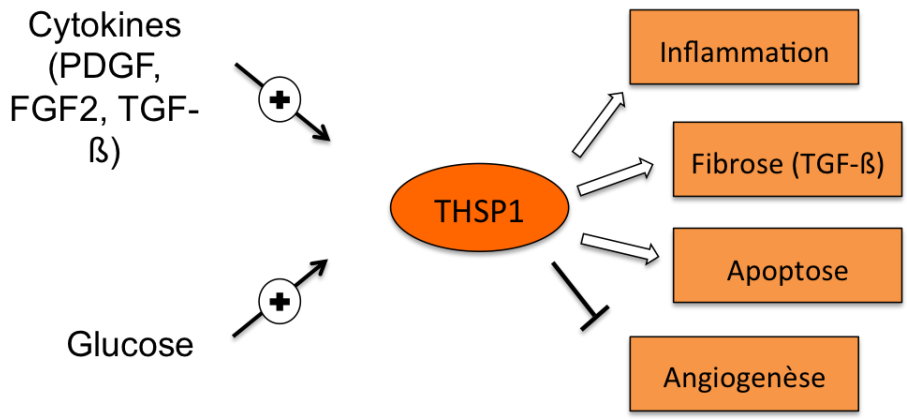


Figure 19 : Fonctions de la thrombospodine-1 (THSP1) au cours des maladies rénales. FGF 2 : Fibroblast Growth Factor 2, PDGF : Platelet-Derived Growth Factor, TGF-ß : Transforming Growth Factor-ß. D'après Hugo and Daniel 2009.

xi. Rab11A

La cible Rab11A a été validée fonctionnellement dans la lignée NRK-52E (cellules tubulaires proximales de rat) (Xiujuan Liu et al. 2015). Les protéines Rab appartiennent à la superfamille des RAS GTPases et participent à la régulation de la dynamique des membranes en particulier des vésicules intra-cellulaires (Figure 20) (Stenmark 2009). Plus précisément, Rab11A est impliquée dans la formation des endosomes de recyclage (Szatmári and Sass 2014).

Une étude a montré que l'inhibition de miR-21 chez des rats soumis à une ischémie-reperfusion améliore les lésions histologiques ainsi que de la fonction rénale et entraine parallèlement une augmentation des marqueurs d'autophagie (Xiujuan Liu et al. 2015). La surexpression de miR-21 dans des cellules NRK-52E (cellules épithéliales rénales de rat) diminue l'expression de Rab11A et augmente l'apoptose cellulaire (Xiujuan Liu et al. 2015). miR-21 inhibe l'autophagie qui serait un mécanisme protecteur au cours de l'ischémie-reperfusion permettant la survie des cellules tubulaires (M. Jiang et al. 2010).

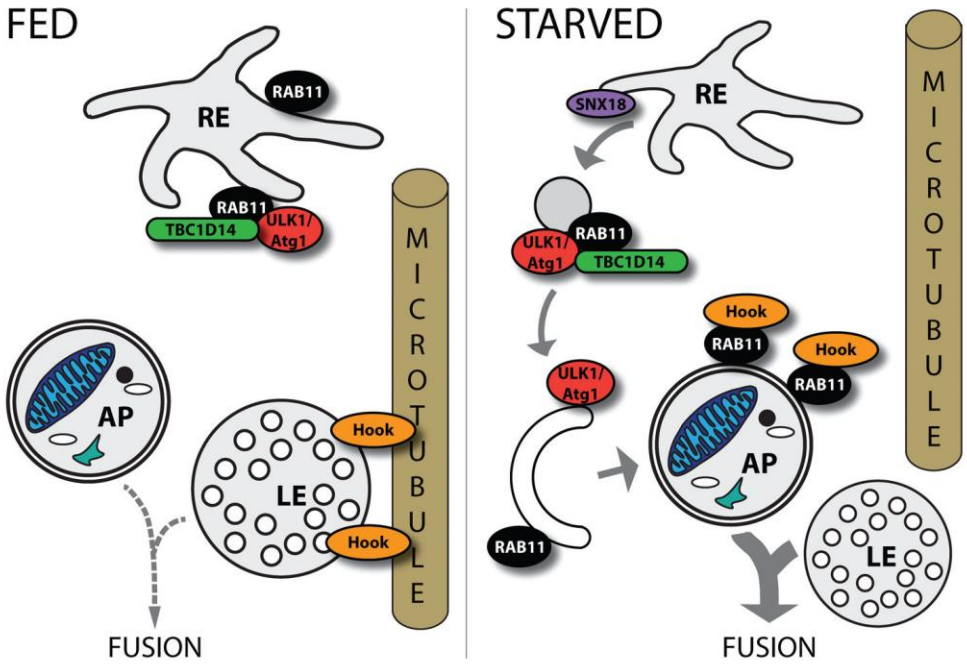


Figure 20 : Localisation et fonction de la protéine RAB11 dans une cellule soumise à un stress induisant l'autophagie. En situation physiologique RAB11 est associé à la membrane de l'endosome de recyclage. Lors de l'activation de l'autophagie, il semble impliqué dans différentes étapes de l'autophagie, notamment dans le transfert de membranes de l'endosome de recyclage vers l'auphagosome et la fusion de l'autophagosome avec l'endosome tardif. AP : Autophagosome, RE : Recycling Endosome, LE : Late Endosome. D'après Szatmári 2014.///

xii. Autres cibles

En plus de ces cibles dont l'interaction avec miR-21 est objectivée par une méthode robuste et mise en évidence dans des modèles de souffrance rénale, de nombreuses autres cibles sont supposées sans avoir été validées expérimentalement. Ainsi, de nombreux travaux ont exploré la régulation de l'inflammation en explorant CCR7 bien que l'interaction avec miR-21 ne soit que supposée (Smigielska-Czepiel et al. 2013), ainsi que les protéines MyD88 et IRAK, toutes deux cibles directes de miR-21 (Yanni Chen et al. 2013) mais pour lesquelles aucune étude n'a exploré le lien avec miR-21 au cours d'une pathologie rénale. D'autres cibles supposées sont impliquées dans la régulation de la matrice extra-cellulaire (MMP9 (Matrix Mettalo Protease 9)) (Jinyang Wang et al. 2013) l'apoptose (p53) (Lai et al. 2015) et le métabolisme lipidique (MPV17L) (Chau et al. 2012).

La multiplicité des voies régulées par miR-21 ainsi que les multiples boucles de régulation reflètent la complexité du rôle de miR-21 en pathologie rénale.

TRAVAUX PERSONNELS

I. Objectifs des travaux

miR-21 joue ainsi un rôle complexe au cours des pathologies rénales, notamment il semble pouvoir jouer un rôle protecteur ou délétère dépendant du contexte. L'objectif des travaux réalisés est d'explorer le rôle de miR-21 dans différents modèles de néphropathie, afin de permettre de préciser l'impact de miR-21 sur la réponse rénale à une agression aiguë ou chronique.

Une première partie du travail a été axée sur l'expression de miR-21 au cours d'une maladie rénale chronique glomérulaire, la néphropathie à dépôts mésangiaux IgA (IgAN). Cette partie a eu pour but d'étayer l'implication de miR-21 (et d'autres miARN connus comme pro-fibrosants) dans les lésions rénales chroniques induites par l'IgAN, en particulier la fibrose interstitielle, l'atrophie tubulaire et la sclérose glomérulaire.

Une seconde partie du travail a été axée sur l'étude du rôle de miR-21 au cours d'une agression rénale aiguë et sub-aiguë. Dans cette optique, un modèle murin de NTA secondaire à l'injection de cisplatine a été mis en place. Nous avons choisi de réaliser deux schémas d'injections différents (une injection unique d'une forte dose (10mg/kg) *versus* des injections répétées (7mg/kg)) afin d'apréhender les conséquences de la délétion de miR-21 au cours d'une lésion rénale aiguë unique ou de lésions rénales répétées et plus prolongées.

II. Implication de miR-21 dans la fibrose au cours de la néphropathie à IgA

1) Contexte

a. Néphropathie à IgA

La néphropathie à dépôts mésangiaux d'Immunoglobuline A (IgA), ou maladie de Berger, est la néphropathie glomérulaire primitive la plus fréquente (Donadio and Grande 2002). Lors du diagnostic, elle se traduit par une hématurie quasi constante, une protéinurie de sévérité variable et parfois une insuffisance rénale. Le principal risque de cette pathologie rénale tient en son potentiel évolutif : 20 à 40 % des patients développeront une insuffisance rénale chronique terminale obligeant à débuter la dialyse ou à réaliser une transplantation rénale (Xie et al. 2012).

La physiopathologie reste imparfaitement élucidée, mais l'hypothèse actuelle est celle de la survenue de plusieurs facteurs déclenchants (« multihit ») sur un terrain génétiquement prédisposé (Kiryluk et al. 2014). Ainsi, il existe initialement un phénomène d'hypogalactosylation des IgA1, conduisant à la synthèse d'anticorps anti-glycane puis à la formation de complexes immuns. Le dépôt de ces complexes immun dans le mésangium glomérulaire peut déclencher une inflammation, et par conséquent de la fibrose glomérulaire puis tubulo-interstitielle.

Le diagnostic positif repose sur la réalisation d'une biopsie rénale et la mise en évidence de dépôts d'Immunoglobulines A1 dans le mésangium glomérulaire. Cette anomalie peut être accompagnée de différentes lésions identifiables en microscopie optique (Figure 21). D'une part, on peut trouver des lésions actives, en particulier une hypercellularité mésangiale (c'est-à-dire l'augmentation du nombre de cellules mésangiales par tige mésangiale), une prolifération endocapillaire (afflux de cellules inflammatoires dans les capillaires glomérulaires) ou une prolifération extra-capillaire (prolifération de cellules de phénotype épithélial dans la chambre urinaire). Il existe d'autre part des lésions séquellaires telles que la sclérose glomérulaire et la fibrose interstitielle (Roberts et al. 2009). Ces lésions sont regroupées dans le score histo-pronostique dit« MEST » de la classification d'Oxford (Cattran et al. 2009; Roberts et al. 2009).

Le pronostic de la maladie est difficile à déterminer lors du diagnostic même s'il existe certains facteurs de risque connus. En effet, la présence d'une protéinurie abondante (supérieure à 1g par jour), d'une insuffisance rénale ou d'une hypertension sont clairement associées à une moins bonne survie rénale (Donadio and Grande 2002; D'Amico 2004). Certains critères histologiques sont également associés à un moins bon pronostic : l'hypercellularité mésangiale, la prolifération extra-capillaire, la sclérose glomérulaire et la fibrose interstitielle (Cattran et al. 2009).

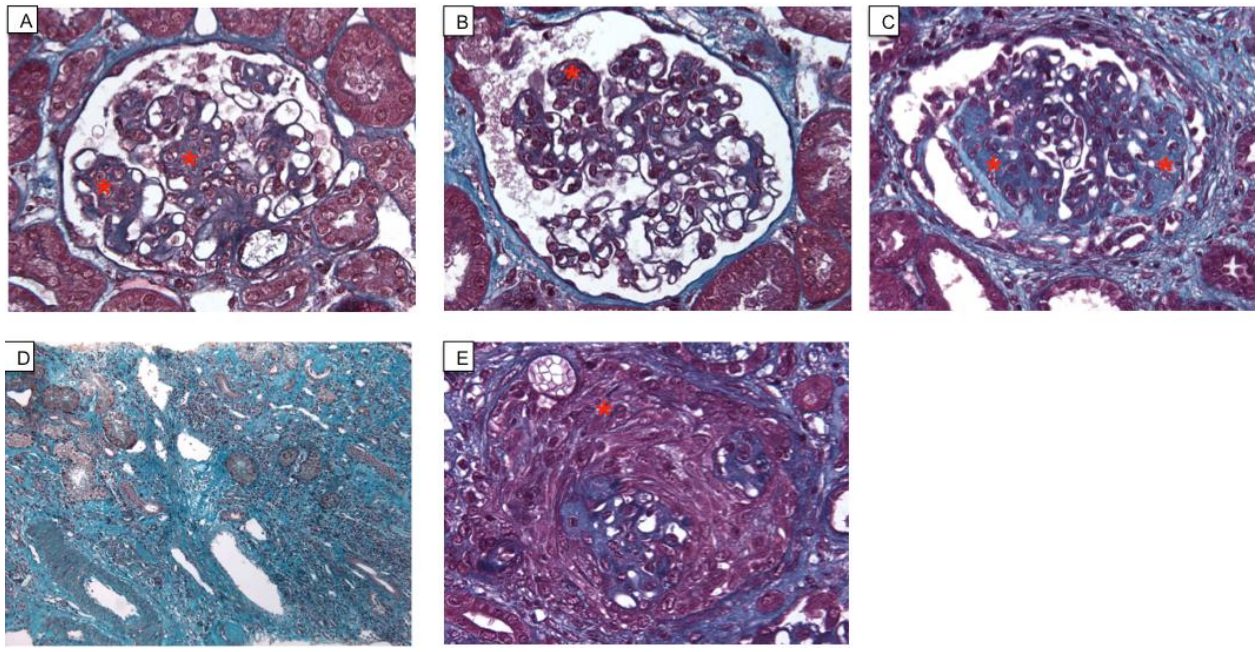


Figure 21 : Coupes de biopsies rénales montrant les lésions observées au cours de la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA. Coloration Trichrome de Masson. A : hypercellularité mésangiale (x500), B : prolifération endocapillaire (x500), C : glomérulosclérose segmentaire (x500), D : fibrose interstitielle en vert (x100), E : prolifération extracapillaire (x500). * Localisation des lésions. Images D. Buob, anatomo-pathologie, Lille.

Actuellement, il n'existe aucun traitement spécifique de cette pathologie. En cas de lésions inflammatoires prolifératives (prolifération extra-capillaire), un traitement immunosuppresseur peut permettre une amélioration du pronostic (Eknoyan et al. 2012). Par contre, dans les formes avec fibrose interstitielle et sclérose glomérulaire, les thérapeutiques ne sont que symptomatiques (contrôle de l'hypertension artérielle, réduction de la protéinurie par des bloqueurs du système rénine-angiotensine) (Donadio and Grande 2002).

b. Fibrose rénale

La fibrose rénale est un processus de réparation excessive en réponse à une agression chronique entrainant la destruction du parenchyme fonctionnel des compartiments interstitiel et glomérulaire. Ce phénomène est commun à toutes les néphropathies et constitue un facteur pronostic péjoratif. Il s'agit d'un phénomène complexe mettant en jeu de nombreux acteurs (Figure 22)**.** Ainsi, lors d'une agression rénale, l'altération de la barrière épithéliale et endothéliale entraine une cascade d'évènements ayant pour but la cicatrisation du tissu (Pottier et al. 2014; S. L. Friedman et al. 2013). Rapidement, une réponse inflammatoire se met en place. Les cellules inflammatoires (lymphocytes T et B, macrophages, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, cellules dendritiques) sont activées et recrutées (Tapmeier et al. 2010; Zeisberg and Neilson 2010) et secrètent des cytokines et chimiokines, entretenant ainsi le phénomène (Wynn 2008). Ces cellules inflammatoires produisent également des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance pour favoriser la phase proliférative de la cicatrisation caractérisée par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le tissu endommagé et le recrutement et l'activation d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes. Les cellules épithéliales et / ou endothéliales stimulées produisent des métalloprotéinases de matrice, entrainant une rupture de la membrane basale (S. L. Friedman et al. 2013). Les fibroblastes activés se différencient en myofibroblastes, exprimant α-SMA et des fibres de stress permettant l'acquisition de propriétés contractiles (S. L. Friedman et al. 2013). Ils sécrètent des niveaux élevés de collagènes et de molécules de la matrice extra-cellulaire (MEC) (Youhua Liu 2011). Les myofibroblastes sont recrutés à partir d'une variété de sources comprenant des cellules mésenchymateuses résidentes et des progéniteurs de moelle osseuse (fibrocytes). Enfin, dans la phase résolutive, si l'agression initiale régresse, les cellules épithéliales et / ou endothéliales se divisent et migrent sur la matrice provisoire pour régénérer le tissu endommagé (Pottier et al. 2014).

Le phénomène devient pathologique lorsqu'il se prolonge dans le temps soit parce que l'agression rénale persiste ou se répète, soit par un défaut de contrôle de la réponse inflammatoire. On observe alors une accumulation excessive de composants de la MEC, en particulier des collagènes fibrillaires I et III et la fibronectine (protéine de structure), et d'autre part de la diminution d'activité des métalloprotéases (Zeisberg and

Neilson 2010). L'épithélium présente de plus des altérations avec amincissement de la membrane basale tubulaire et raréfaction des cellules épithéliales. En effet, dans ce contexte les cellules épithéliales subissent un phénomène de mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Fiers et al. 1999; S. L. Friedman et al. 2013) ou se dédifférencient pour acquérir un phénotype mésenchyateux (S. L. Friedman et al. 2013; Simon and Hertig 2015).

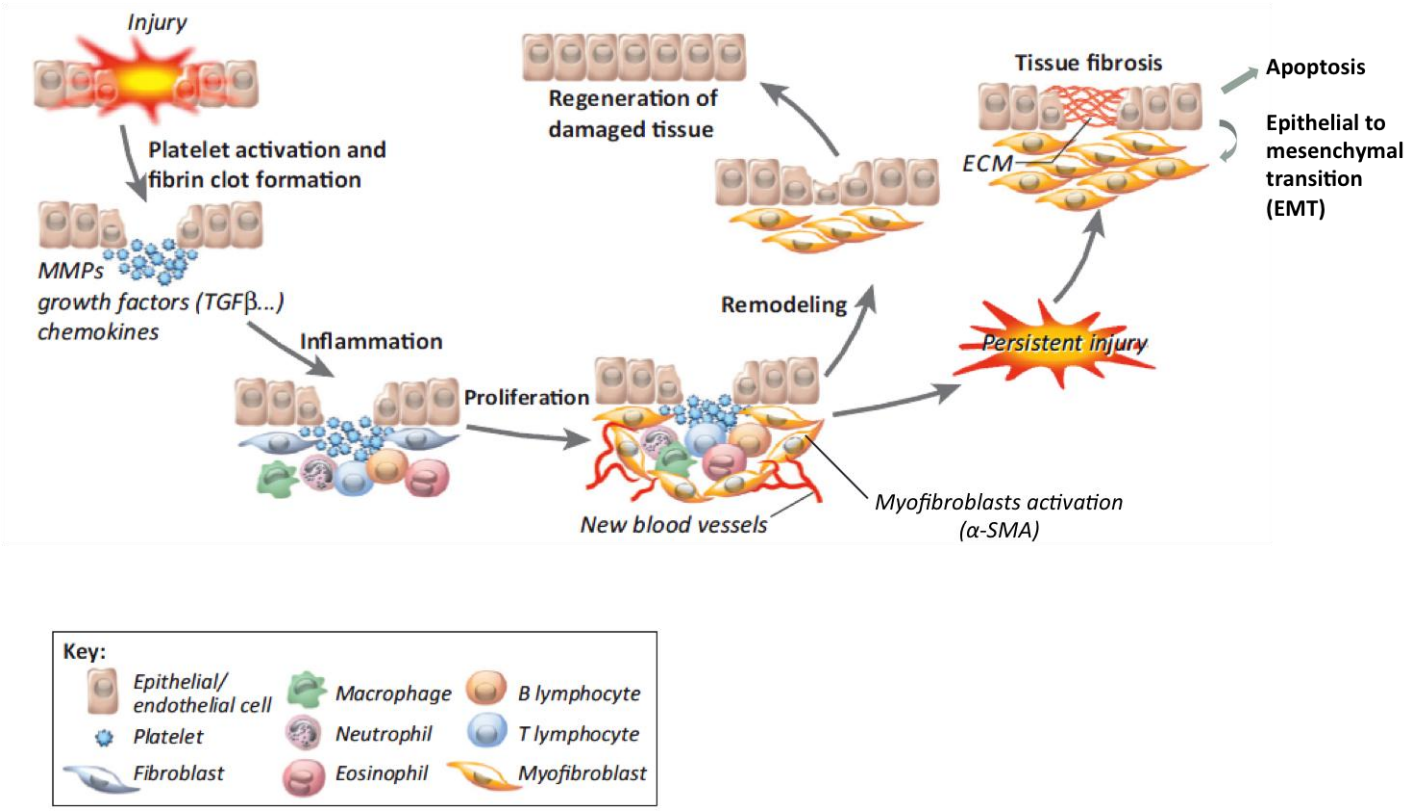


Figure 22 Réponse à une lésion tissulaire : réparation ou fibrose. Afflux inflammatoire, activation des myofibroblastes, production de matrice extra-cellulaire, Transition Epithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules tubulaires. D'après Pottier et al. 2014.

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un phénomène complexe par lequel une cellule épithéliale polarisée modifie son phénotype pour acquérir des propriétés mésenchymateuses (Figure 23) telles que la perte d'adhésion à sa membrane basale, des capacités de migration et d'invasion, une résistance accrue à l'apoptose et

une production de composants de la MEC (Kalluri and Weinberg 2009). Ainsi, cette modification phénotypique s'accompagne d'une perte de marqueurs épithéliaux, en particulier les molécules d'adhésion comme la E-Cadhérine ou ZO-1 (Zona Occludens protein 1) et au profit de marqueurs mésenchymateux comme l'α-SMA, la vimentine, FSP1 (Fibroblast-Specific Protein 1) et le PDGFRβ (Platelet-Derived Growth Factor Receptor β) (Kalluri and Weinberg 2009).

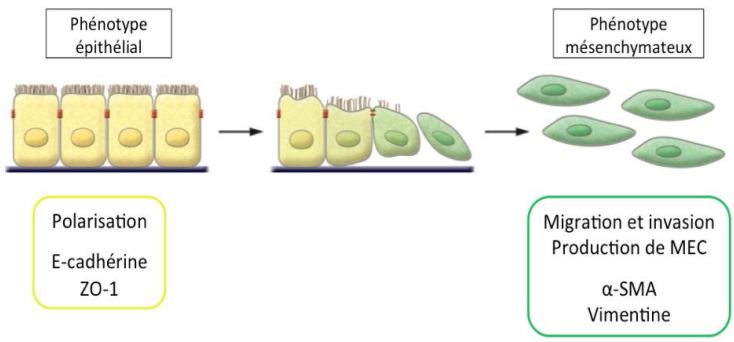


Figure 23 : Modifications phénotypiques liées à la TEM. A gauche cellules de phénotype épithélial ; à droite, acquisition de caractères mésenchymateux. D'après Kalluri and Weinberg 2009.

Le processus de fibrogenèse est régulé entre autres par l'équilibre entre cytokines profibrosantes (TGF-ß, PDGF (Platelet-Derived Factor), FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2, CTGF (Connective Tissue Growth Factor) et angiotensine 2) et anti-fibrosantes (HGF (Hépatocyte Growth Factor), BMP7 (Bone Morphogenetic Protein 7) par inhibition de la voie du TGF-β) (Youhua Liu 2011). Parmi les mécanismes permettant cette régulation, les progrès réalisés ces dernières années dans la connaissance du génome ont permis d'identifier les microARN comme régulateurs du processus de fibrogenèse (Chung and Lan 2015; Van der Hauwaert et al. 2015; Gomez, Nakagawa, and Duffield 2016).

c. *MicroARN dans la néphropathie à IgA*

Parmi les travaux s'intéressant à la physiopathologie de la néphropathie à IgA, certaines équipes ont pu mettre en évidence l'implication de plusieurs miARN dans les mécanismes physio-pathologiques à l'origine de cette pathologie. A titre d'exemple, la

dérégulation de miR-148b and let-7b semble impliquée dans les anomalies de glycosylation des IgA1 (Serino et al. 2012).

L'équipe de Wang et al. a montré des modifications de microARN tissulaires spécifiques (augmentation de miR-141 (G. Wang, Kwan, Lai, Choi, et al. 2010), miR-205 (G. Wang, Kwan, Lai, Choi, et al. 2010), miR-192 (G. Wang, Kwan, Lai, Choi, et al. 2010), miR-146a (G. Wang et al. 2011) and miR-155 (G. Wang et al. 2011) et diminution de miR-200c (G. Wang, Kwan, Lai, Choi, et al. 2010)) dans des biopsies de patients porteurs d'une néphropathie à IgA comparé à des patients atteints de glomérulosclerose d'étiologie non inflammatoire. La même équipe a montré que l'expression rénale de miR-205 (G. Wang, Kwan, Lai, Choi, et al. 2010) et de miR-155 (G. Wang et al. 2011) est associée à la sévérité de la fibrose interstitielle. L'expression rénale de miR-192 (G. Wang, Kwan, Lai, Choi, et al. 2010) et urinaire de miR-93 (G. Wang, Kwan, Lai, Chow, et al. 2010) est associée à la sclérose glomérulaire.

Récemment, Bao et al. ont montré que miR-21 est surexprimé dans le tissu de patients porteurs d'une néphropathie à dépôts d'IgA comparé à du tissu rénal sain. De plus, la surexpression de miR-21 est associée aux lésions fibroses, en particulier tubulo-interstitielles (Bao et al. 2014).

d. Objectifs des travaux

Nous avons constitué une cohorte de patients porteurs d'une néphropathie à IgA ayant bénéficié d'une biopsie rénale entre 2002 et 2012. Un premier travail a permis de caractériser cette cohorte et de valider les critères d'Oxford après une réévaluation en aveugle de chaque biopsie rénale. Nous avons ensuite analysé l'expression rénale de 3 microARN, connus pour être impliqués dans le processus de fibrose (ou « FibromiR ») (Pottier et al. 2014), nommément miR-21, miR-214-3p et miR-199a-5p, dans cette cohorte, et analysé leur association avec les paramètres clinico-biologiques et histologiques.

2) Travaux

a. *Communications affichées*

i. *Société de néphrologie Octobre 2013*

Annexe 1 page 135.

ii. *American Society of Nephrology Novembre 2014*

Annexe 2 page 136.

b. *Publication*

L'expression rénale de miR-21-5p et associée à la fibrose et à la survie rénale au cours de la néphropathie à IgA

miR-21-5p renal expression is associated with fibrosis and renal survival in patients with IgA nephropathy

Marie-Flore Hennino[1,2], David Buob[3], Cynthia Van der Hauwaert[1], Viviane Gnemmi[4],Zacharie Jomaa[5], Nicolas Pottier[1], Grégoire Savary[1], Elodie Drumez[6], Christian Noël[7], Christelle Cauffiez[1] & François Glowacki[1].

Scientific Reports, 2016 Jun 6 ; 6:27209 (Hennino et al. 2016).

[1]Univ. Lille, CHU Lille - Service de néphrologie, Institut Pasteur de Lille, EA 4483 - IMPECS - IMPact of Environmental ChemicalS on human health, F-59000 Lille, France. [2]Centre Hospitalier de Valenciennes - Service de néphrologie, médecine interne et vasculaire, F-59300 Valenciennes, France.

[3]Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, Inserm, AP-HP, Hôpital Tenon, Pathology Department, UMR S 1155, F-75020 Paris, France.

[4]Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172 - JPArc - Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France.

[5]Centre Hospitalier de Cambrai - Service de néphrologie, F-59400 Cambrai, France.

[6]Univ. Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique: épidémiologie et qualité des soins, F-59000 Lille, France.

[7]Univ. Lille, Inserm, CHU Lille - Service de néphrologie, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France.

Les résultats de ce travail sont présentés en Annexe 3 page 137.

3) Discussion

Nos travaux ont permis de caractériser une cohorte de patients porteurs d'une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, dont l'expression et l'évolution est très hétérogène. Notre cohorte de patient était représentative des patients porteurs d'une néphropathie à dépôts d'IgA, avec une grande variabilité dans la sévérité des patients. De plus, nous avons pu valider la classificiation d'Oxford sur notre échantillon de patients et retrouver les fibroses glomérulaire et interstitelle comme facteurs pronostiques. Les résultats confirment que l'expression rénale de miR-21 est fortement associée aux lésions de fibrose glomérulaires ou tubulaires au cours de la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA comme cela a été montré dans cette pathologie (Bao et al. 2014), mais également dans de nombreuses autres néphropathies (Tableau 1). De plus, miR-21 est associé au pronostic rénal en analyse univariée. Les résultats sont principalement limités par le caractère rétrospectif et l'absence d'analyse multivariée liée au nombre limité de patients (n=62) et au faible nombre d'évènements (n=17). Ces résultats sont cohérents avec l'ensemble des résultats publiés sur les néphropathies chroniques (Tableau 1), à l'exception de ceux de Wang et al. (G. Wang et al. 2013) et Szeto et al. (Szeto et al. 2012), montrant que l'augmentation de miR-21 urinaire est associée à un meilleur pronosctic rénal. Toutefois, les difficultés techniques inhérentes à l'utilisation de miR-21 en tant que biomarqueur rendent ces disordances difficiles à analyser.

L'intérêt de ce travail a été de renforcer les arguments montrant l'association de miR-21 avec des lésions fibreuses rénales quelle qu'en soir l'étiologie. L'analyse de l'implication de miR-21 au cours d'une agression rénale est donc un enjeu de taille, puisqu'elle s'appliquerait à un large champ de néphropathies chroniques. En conséquence, l'utilisation de miR-21 en tant que biomarqueur de l'activité fibrosante d'une maladie pourrait être un complément intéressant pour aider à déterminer le pronostic très variable de cette pathologie, mais également dans le suivi des patients, notamment pour éviter des biopsies itératives. De plus, dans plusieurs modèles murins, miR-21 semble une cible thérapeutique prometteuse (Chau et al. 2012; Gomez et al. 2015). L'utilisation d'un antagoniste de miR-21 dans un modèle murin de néphropathie à IgA pourrait être un premier pas vers la validation de cette thérapeutique au cours de cette pathologie.

III. Implication de miR-21 au cours de l'insuffisance rénale aiguë : modèle de la toxicité tubulaire du cisplatine

1) Contexte

a. *Cisplatine*

i. *Généralités*

Le cisplatine *(cis*-diamminedichloroplatinum [II] ou CDDP) est l'un des agents chimiothérapeutiques les plus couramment utilisés. La structure du CDDP se caractérise par une configuration en plan carré composé d'un atome de platine central, de deux groupements amine et deux groupements chlorure (Figure 24A). Cette structure initialement inerte devient hautement réactive au contact de l'eau présente dans le cytosol et forme des liaisons covalentes avec la méthionine et les peptides riches en cystéines comme le glutathion réduit et les métallothionéines. Ces interactions induisent au niveau cytosolique une déplétion en équivalent réduit générant un stress oxydant responsable d'effets cytotoxiques directs ainsi que de dommages à l'ADN. Le CDDP est également un agent alkylant de l'ADN, qui se fixe sélectivement sur les bases puriques de l'ADN (principalement des guanines) et induit une déformation locale du double brin d'ADN à l'origine de l'inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN et conduisant à terme à la mort cellulaire principalement par apoptose (Macciò and Madeddu 2013) (Figure 24B).

Les propriétés anti-cancéreuses des sels de platine ont été mises en évidence en 1965 au cours d'une étude portant sur l'influence d'un champ électrique sur la croissance d'*Escherichia Coli* (Rosenberg, Vancamp, and Krigas 1965). L'inhibition de la prolifération bactérienne observée reflétait l'effet des sels de platine provenant de l'électrolyse des électrodes. Depuis la première administration chez l'homme dans les années 1970 (Lippman et al. 1973), le cisplatine, qui est le sel de platine présentant la meilleure efficacité, a pris une place importante dans l'arsenal thérapeutique anti-cancéreux et a actuellement de larges indications, notamment dans les néoplasies de la sphère aéro-digestive, pulmonaires, gynécologiques et urologiques (Kelland 2007). L'utilisation du cisplatine est cependant limitée par des effets indésirables pouvant interdire la poursuite de la thérapeutique, dont les principaux sont la néphrotoxicité, l'ototoxicité, la neurotoxicité et la myélotoxicité (Hartmann and Lipp 2003; Macciò and

Madeddu 2013). Le carboplatine et l'oxaliplatine représentent deux sels de platine alternatifs, développés plus tardivement, présentant un meilleur profil de tolérance. Ils sont indiqués dans certains schémas thérapeutiques (néoplasies gynécologiques et digestives respectivement) ou en alternative au cisplatine lorsque son utilisation est limitée par les effets indésirables (Kelland 2007).

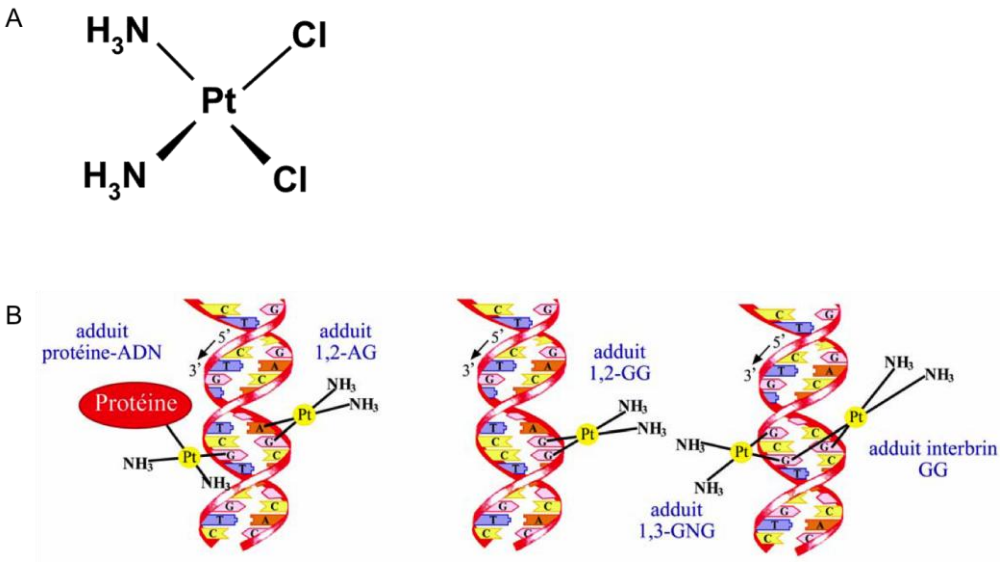


Figure 24 : Structure et mécanisme d'action du cisplatine. (A) : Structure moléculaire du cisplatine. (B) : Mécanisme d'action du cisplatine : formation d'adduits à l'ADN, principalement en intra-brin (adduits 1,2-AG, 1,2-GG, 1,3-GNG), et plus rarement en interbrin ou en association à une protéine. D'après thèse de M.A. Elizondo-Riojas, 2001.

ii. Métabolisme rénal du cisplatine

Le cisplatine est fortement lié aux protéines plasmatiques (>90%) (Hartmann and Lipp 2003). Le cisplatine non lié est librement filtré par la membrane basale glomérulaire puis éliminé dans les urines. Il ne semble pas y avoir de réabsorption tubulaire (Macciò and Madeddu 2013). Deux transporteurs semblent particulièrement impliqués dans le transport tubulaire : le Copper transporter 1 (Ctr1) situé au pôle baso-latéral de la cellule tubulaire proximale et distale (Pabla et al. 2008) et l'organic cation transporter 2 (OCT2) exprimé de façon spécifique au pôle baso-latéral de la cellule tubulaire proximale (Ciarimboli 2014). La prise en charge du cisplatine par la glutathion-S-transferase puis par la gamma-glutamyltranspeptidase, conduit à la

synthèse d'un composé hautement néphrotoxique (Pabla and Dong 2008; Townsend et al. 2009).

iii. Toxicité rénale du cisplatine

Le cisplatine induit principalement des lésions de la cellule tubulaire proximale, induisant diverses anomalies tubulaires (syndrome de Fanconi, hypomagnésémie, acidose tubulaire....) pouvant aller jusqu'à l'insuffisance rénale aigue (IRA) chez 20% à 30% des patients traités par cette molécule (Miller et al. 2010). Les facteurs de risque de développement d'une IRA sont l'existence d'une déshydratation extra-cellulaire non corrigée, d'un sepsis, la prise concomitante d'un autre composé néphrotoxique (anti-inflammatoires non stéroïdiens, produits de contraste iodés), une dose élevée de cisplatine et un âge élevé (Miller et al. 2010). Parmi les sels de platine, le cisplatine est la molécule présentant les effets néphrotoxiques les plus marqués, nécessitant parfois d'interrompre ce traitement ou d'en réduire les posologies, entrainant ainsi des conséquences sur le pronostic lié à la maladie cancéreuse.

Quatre principaux mécanismes sont mis en jeu dans la néphrotoxicité du cisplatine. La lésion la plus fréquemment observée sur les analyses histologiques correspond à une toxicité tubulaire directe par apoptose et nécrose des cellules épithéliales (Oh et al. 2014). Le cisplatine induit l'apoptose par différentes voies (Figure 25). Il active la voie extrinsèque de l'apoptose *via* les récepteurs de mort TNF-α, Fas, puis recrute la caspase 8, activant la voie commune des caspases (Tsuruya et al. 2003). La voie mitochondriale intrinsèque de l'apoptose est également directement activée par le cisplatine (M. S. Park, De Leon, and Devarajan 2002), probablement par la production d'espèces réactives de l'oxygène. De plus, le cisplatine induit un stress du réticulum endoplasmique, participant également en phénomène d'apoptose (Peyrou, Hanna, and Cribb 2007). Le cisplatine induit enfin une vasoconstriction aggravant les lésions de nécrose tubulaire aiguë, des lésions interstitielles médiées par l'inflammation et, dans une moindre mesure des lésions glomérulaires, se traduisant par une rétraction glomérulaire (Oh et al. 2014).

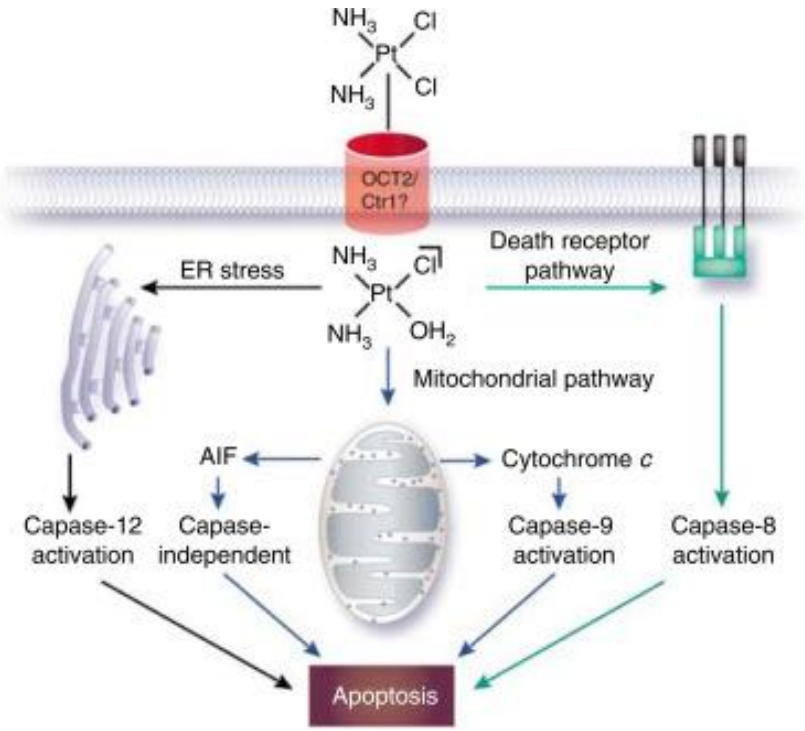


Figure 25 : Voies d'apoptose impliquées dans la toxicité du cisplatine sur les cellules tubulaires rénales. Le cisplatine active l'apoptose par la voie mitochondriale intrinsèque (bleu) et la voie extrinsèque des récepteurs de mort (vert). De plus l'induction du stress du réticulum endoplasmique (gris) pourrait également être impliqué. L'activation des différentes voies conduit à une apoptose dépendante ainsi qu'indépendante des caspases. D'après Pabla and Dong 2008.

Si la survenue d'une insuffisance rénale aiguë suite à l'injection de cisplatine est un événement bien caractérisé, les effets à long terme d'injections répétées de sels de platine sont moins bien connus (O'Sullivan 2016). Récemment, un modèle murin a montré que des injections de faibles doses répétées de cisplatine (7mg/kg) entrainaient, outre des lésions de nécrose tubulaire aiguë, des lésions de fibrose rénale (Sharp et al. 2016). Une équipe anglaise (Skinner et al. 2009) a suivi pendant 10 ans 63 enfants traités par des sels de platine, mettant ainsi en évidence des séquelles rénales à 10 ans (insuffisance rénale chronique, hypomagnésémie). Plus récemment, une étude rétrospective a montré sur une cohorte rétrospective de 821 adultes suivis pendant 5 ans, que l'administration de cisplatine entrainait, à distance, une altération constante et modérée de la fonction rénale (Latcha et al. 2016).

b. miARN et cisplatine

Peu de données concernant l'implication des miARN dans la néphrotoxicité du cisplatine sont actuellement disponibles (Herrera-Pérez, Gretz, and Dweep 2016). En ce qui concerne miR-21, seule une étude longitudinale de 108 patients traités pour un mésothéliome a montré que la concentration urinaire de miR-21 augmentait après administration intra-pleurale de cisplatine mais n'était pas prédictive d'insuffisance rénale aigue (Pavkovic et al. 2016).

Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle des microARN dans le développement des résistances aux chimiothérapies, notamment dans le cancer bronchique non à petites cellules (Ying Chen et al. 2015) ou encore dans le cancer ovarien (Samuel et al. 2016). Un taux élevé de miR-21 est en particulier impliqué dans la résistance aux traitements dans de nombreux types cancéreux dont le carcinome œsophagien (miR-21 circulant) (Komatsu et al. 2016), le carcinome urothélial avancé (miR-21 dans le tissu tumoral) (Bellmunt et al. 2016) ou encore le cancer pulmonaire non à petites cellules (miR-21 dans le tissu tumoral) (Z. Yang et al. 2015).

2) Rôle de miR-21 dans la néphrotoxicité du cisplatine : travaux non publiés

Cette étude se base sur des travaux préliminaires déjà réalisés au laboratoire. En effet, la mise en place d'un modèle murin de néphrotoxicité induite par le cisplatine a permis de confirmer que l'administration de cisplatine induit une souffrance rénale d'autant plus importante que la dose de cisplatine est élevée (Figure 26). La sévérité de l'atteinte rénale a été déterminée grâce à la mesure de l'expression du gène *NGAL* (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin). NGAL est une protéine utilisée en clinique en tant que biomarqueur de lésions rénales (Andreucci et al. 2016). Le cisplatine induit également un stress oxydant, dont l'augmentation de l'expression HO-1 (Heme Oxygenase-1) est le reflet. De manière intéressante, après une exposition au cisplatine, l'expression rénale de miR-21 est augmentée.

Ce modèle expérimental combiné à l'utilisation d'une lignée de souris déficientes pour miR-21 a pour objectif d'évaluer l'implication du microARN miR-21 dans le phénomène de néphrotoxicité aigue induit par le cisplatine et d'évaluer la pertinence de l'inhibition de ce miARN comme stratégie de prévention de la néphrotoxicité induite par

le cisplatine. Notre objectif est également d'observer un facteur chronologique dans l'effet de miR-21 sur les phénomènes de néphrotoxicité aigue. Pour cela nous utiliserons deux protocoles différents d'administration du cisplatine (injection unique ou répétée).

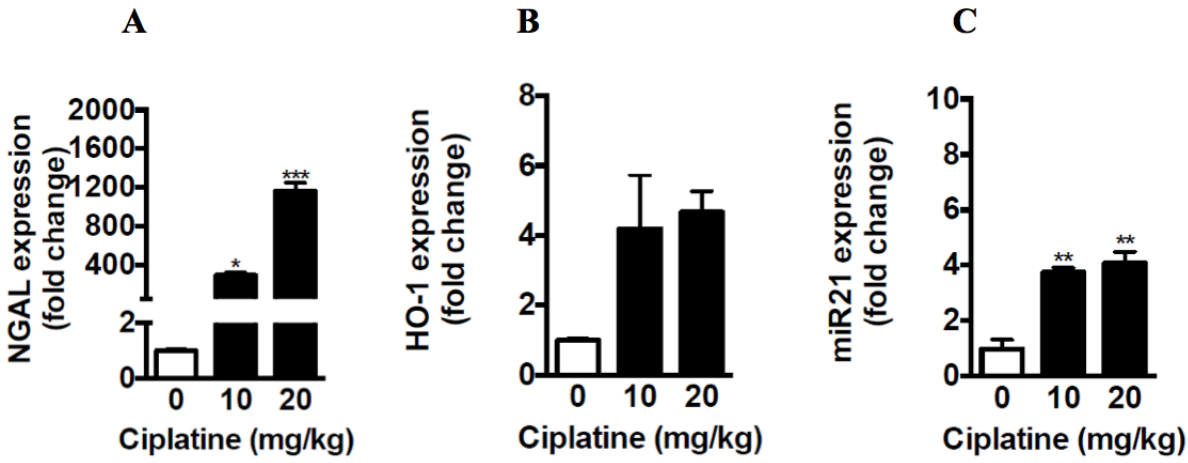


Figure 26 : Modèle murin d'exposition au cisplatine. Expression du gène NGAL (A), du gène HO-1 (B) et du microARN miR-21 (C) après une exposition à différentes concentrations de cisplatine (0, 10, 20 mg/kg). n = 4 animaux/groupes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (comparé à la dose 0 de cisplatine).

c. *Matériel et méthodes*

i. *Modèle murin*

Des souris mâles âgées de 8 semaines, de fond génétique C57BL6/J de phénotype sauvage (Charles River) ou invalidées pour miR-21 (*miR-21*$^{-/-}$) ont été utilisées (collaboration Dr Eric Olson, Université du Texas). Deux protocoles ont été réalisés afin d'explorer le rôle de miR-21 au cours de la néphropathie au cisplatine (Figure 27).

- ✓ Un premier protocole a évalué l'impact d'une injection intra péritonéale unique de PBS (Phosphate Buffer Saline) ou de 10 mg/kg de cisplatine. Deux manipulations successives ont été réalisées comprenant respectivement cinq et quatre souris sauvages et six et dix souris *miR-21*$^{-/-}$. Seule une souris de chaque groupe a reçu du PBS lors de la première manipulation. Le sacrifice était réalisé à J4 post-injection (Figure 27A).

- ✓ Un second protocole a évalué l'impact d'injections intra-péritonéales répétées de doses plus faibles de cisplatine (7 mg/kg) chez sept souris sauvages et neuf souris *miR-21*$^{-/-}$. Une souris de chaque groupe a reçu du PBS, les autres du cisplatine. Trois administrations de cisplatine ont été réalisées selon le schéma présenté Figure 27B.

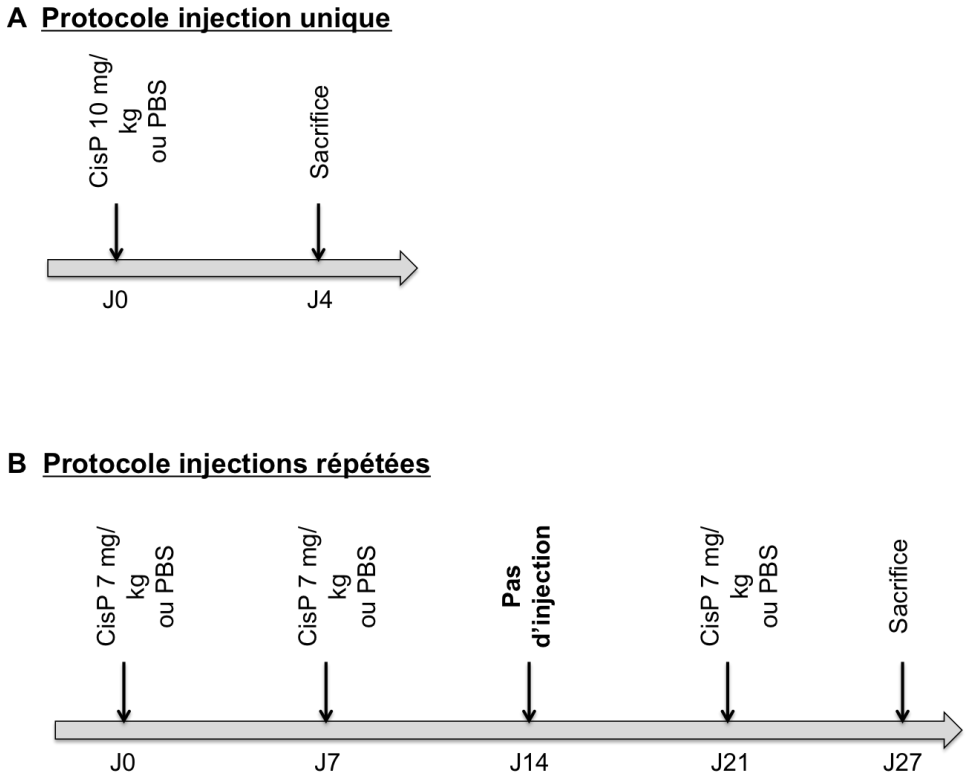


Figure 27 : Schémas de protocoles d'injections intra-péritonéale du cisplatine. A : injection unique. B : injections répétées.

Un suivi régulier des poids et de l'état général des souris a été réalisé. Des prélèvements sanguins ont été effectués sous anesthésie générale dans le sinus rétro-orbitaire sur tube hépariné, juste avant le sacrifice (J4 pour l'administration unique et J27 pour l'administration répétée). Les échantillons ont été centrifugés à 1500g pendant 15 minutes à température ambiante) et le plasma ainsi obtenu est conservé à -20°C. Au sacrifice, les reins des souris ont été prélevés. Un rein a été plongé dans du formol. Le second rein a été coupé dans le plan frontal en deux parties égales. Un échantillon est plongé dans l'azote puis conservé à -80°C pour l'analyse protéique. L'autre échantillon est plongé dans du RNAlatter (Thermofisher) pendant 24°C puis conservé à -80°C.

ii. Dosage de l'urée

Après dilution des prélèvements au quart dans du sérum salé isotonique, l'urée est mesurée par méthode enzymatique grâce à l'automate Cobas 8000 (Roche Diagnostics) du Centre de Biologie et Pathologie du CHRU de Lille (Dr N. Pottier).

iii. Analyse histologique

Les reins sont ouverts en deux avant d'être plongés dans le formol afin de permettre une fixation optimale en 24h. Les organes sont ensuite transférés dans un bain d'éthanol à 70% puis inclus en paraffine. Les coupes effectuées sont colorées par la coloration hématoxyline éosine (HE) pour analyser les structures globales du rein.

Les lames ont été analysées par un anatomopathologiste (Dr V Gnemmi) et un score d'atteinte tubulaire rénale a été attribué de la manière suivante :
0 = pas de lésion;
1 = lésion minimale caractérisée par la présence de nécrose et de débris;
2 = lésion légère avec nécrose cellulaire unique, cellules pyknotiques et apoptose;
3 = lésion modérée caractérisée par une dilatation tubulaire, une vacuolisation et quelques débris cellulaires;
4 = lésions sévères avec quelques cylindres hyalins observées, de la nécrose épithéliale ponctuelle et un épithélium tubulaire aminci;
5 = lésions très sévères caractérisées par une nécrose épithéliale tubulaire étendue dans tous les segments, une perte de la couche épithéliale provenant de nombreux tubules avec des débris cellulaires intraluminaux répandus et des cylindres hyalins fréquents particulièrement importants dans la région médullaire.

iv. Mesure quantitative des miARN et des ARNm tissulaires

✓ *Extraction des ARN totaux*

L'extraction des ARN totaux tissulaires, dont les microARN, a été réalisée à partir d'un demi-rein. Les reins sont placés dans 5mL de Trizol (Thermofisher) dans des tubes M (Miltenyi Biotec) adaptés à la dissociation des tissus. La dissociation est faite avec l'appareil gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec). Après l'ajout de 1mL de chloroforme, les échantillons sont agités vigoureusement pendant au minimum 15 secondes, puis incubés 2 à 3 minutes à température ambiante. Après centrifugation à

4°C pendant 45 minutes à 4000g, la phase supérieure aqueuse contenant les ARN est récupérée (environ 2,5mL). Après ajout de 2,5mL d'isopropanol et 10 minutes d'incubation à température ambiante, les échantillons sont à nouveau centrifugés pendant 45 minutes à 4000g à 4°C, permettant de constituer un culot d'ARN. Le surnageant est éliminé. Deux lavages successifs sont effectués par ajout de 5mL d'éthanol à 75% suivi d'une centrifugation (15 minutes, 4000g, 4°C). Les tubes sont séchés à l'air libre. Le culot d'ARN est dilué dans 300µL d'eau RNAse-free. La concentration en ARN totaux est évaluée par spectrophotométrie (260nm) à l'aide du Biotech Spec-nano (Shimadzu Biotech).

- ✓ *Expression des miARN matures*

La rétro-transcription est réalisée sur un volume total de 15 µL à partir de 5ng d'ARN total à l'aide du kit TaqMan. microARNReverse Transcription Kit (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. La rétrotranscription a été réalisée avec la sonde spécifique TaqMan microRNA hsa-miR-21 (assay 397, Life Technologies) et la sonde TaqMan microRNA snoRNA-251 (assay 1236, Life Technologies) servant de référence. La rétro-transcription est réalisée dans un thermocycleur Verity (Life Technologies).

La PCR en temps réel est réalisée en chimie TaqMan à partir de 1,4µL de produit de rétro-transcription, 10µL de tampon TaqMan. Universal MasterMix II, no UNG (Life Technologies) et 1µL de sonde spécifique TaqMan. La réaction d'amplification est réalis.e sur l'appareil StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies). Les échantillons sont réalisés en duplica. L'analyse des données est effectuée par la méthodecomparative des ΔΔCt. Le Cycle Threshold (Ct) correspond au seuil à partir duquel le niveau defluorescence est significativement différent de celui du bruit de fond. Le nombre de transcrits est normalisé par rapport au microARN de référence par la formule suivante : $\Delta Ct = Ct^{\text{miARN d'intérêt}} - Ct^{\text{sno251}}$. La relation mathématique $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dans laquelle $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^{\text{échantillon cible}} - \Delta Ct^{\text{échantillon contrôle}}$, permet d'exprimerles niveaux d'expression relative (RQ) d'un échantillon (Livak and Schmittgen 2001).

- ✓ *Expression des ARNm*

La rétro-transcription est réalisée sur 1µg d'ARN total à l'aide du kit High

Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. La rétrotranscription est réalisée dans le thermocycleur Verity (Life Technologies). La PCR en temps réel est réalisée en duplicat en chimie TaqMan à partir de 1µL de produit de rétro-transcription, 10µL de tampon TaqMan Universal MasterMix II, no UNG (Life Technologies) et d'1µL de sondes TaqMan spécifiques. Les sondes utilisées (Life Technologies) sont les suivantes : KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1) (gène HAVCR1, assay Mm00506686_m1), NGAL (gène LCN-2, assay Mm01324470_m1), HO-1 (gène HMOX-1, assay Mm00516005_m1), NRF-2 (Nuclear Factor Erythroid-Derived-2 like-2) (gène NFE2L2, assay Mm00477784_m1), TNF-α (assay Mm00443258_m1) et IL-6 (assay Mm00446190_m1). Le gène de référence utilisé est la cyclophiline A (gène PPIA, assay Mm02342430_g1). La réaction d'amplification est réalisée sur l'appareil StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies). L'analyse des données est effectuée par la méthode comparative des ΔΔCt décrite ci-dessus pour les miARN.

v. Mesure de l'activité des caspases 3 et 7

La mesure de l'activité des caspases 3 et 7 est réalisée à l'aide du kit Caspase-Glo 3/7Assay (Promega) avec quelques modifications. Vingt mg de chaque rein sont placés dans 2mL de PBS contenant 2mM d'EDTA, puis dissociés grâce à l'appareil gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec) dans des tubes M (Miltenyi Biotec). Après une centrifugation de 5 minutes, le surnageant est récupéré. Cent µL de chaque échantillon sont placés dans une plaque 96 puits, puis 100µL de Caspase-Glo 3/7 Reagent (Promega) préparés selon la notice du fournisseur. Après 3 heures d'incubation à température ambiante, le signal luminescent est mesuré par l'appareil GloMax-Multi Detection System (Promega).

vi. Statistiques

Les statistiques ont été sur le logiciel PRISM 7. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Le test de ANOVA ou le test t-student est utilisé pour comparer les groupes de souris. Le résultat est considéré comme significatif si $p < 0,05$.

d. <u>Résultats</u>

i. Protocole injection unique de 10mg/kg de cisplatine

Toutes les souris ayant reçu du cisplatine présentent une altération de leur état général se traduisant par une perte de poids (Figure 28A) et une dégradation de leur fonction rénale caractérisée par une urémie significativement augmentée (Figure 28B). Par contre, bien qu'aucune différence significative ne soit observée, les souris déficientes pour miR-21 ayant reçu du cisplatine ont perdu légèrement plus de poids que les souris WT ayant reçu la même dose de cisplatine. De plus, les scores de lésions rénales sont plus élevés chez les souris déficientes pour miR-21 (2.75 versus 3.8) (Figure 29).

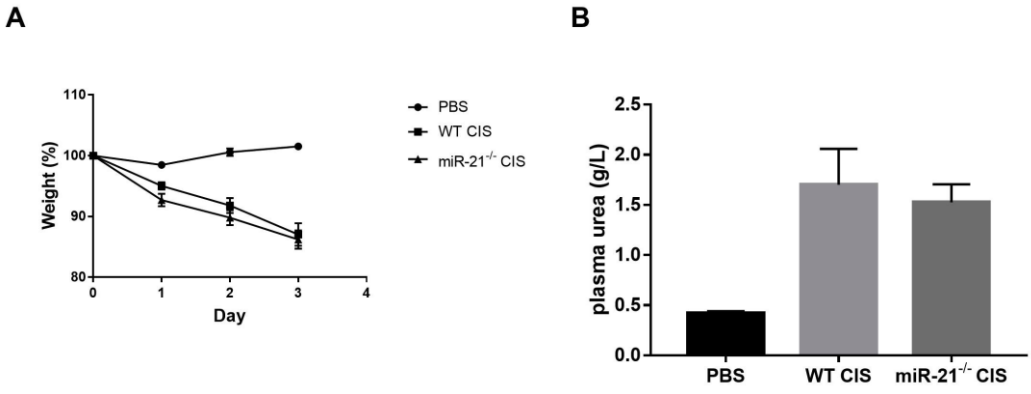


Figure 28 : Le cisplatine induit une perte de poids et une dégradation de la fonction rénale. (A) Courbes de poids chez les animaux ayant reçu une dose de 10mg/kg de cisplatine ou une injection de PBS. (B) Urémie chez les animaux ayant reçu une dose de 10mg/kg de cisplatine ou une injection de PBS. PBS : Phosphate Saline Buffer. n = 2, WT CIS : n = 8, *miR-21*$^{-/-}$: n= 15.

Comme attendu, miR-21 n'est pas exprimé dans les reins des souris déficientes pour *miR-21*$^{-/-}$. L'injection unique de cisplatine à 10 mg/kg induit une augmentation de l'expression de miR-21. (Figure 30A). Toutefois, un seul animal ayant reçu du PBS, cette induction n'est pas significative dans notre étude.

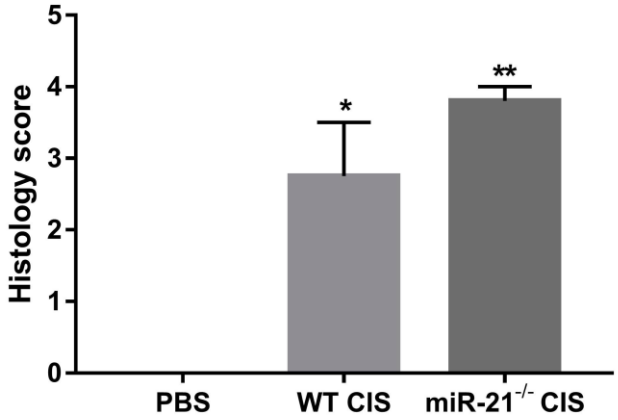


Figure 29 : Le cisplatine induit des lésions rénales : scores histologiques. Score d'atteinte tubulaire évalué sur les coupes de reins provenant des souris ayant reçu une dose de 10mg/kg de cisplatine ou une injection de PBS. PBS : n = 2, WT CIS : n = 8, *miR-21*$^{-/-}$: n= 15. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

La souffrance rénale a été déterminée de manière plus précise par la mesure de l'expression des gènes KIM-1 et NGAL, deux marqueurs précoces de souffrance rénale (Figure 30B-C). Suite à l'administration de cisplatine, l'expression de ces deux gènes est augmentée dans les deux groupes d'animaux traités. Le faible nombre d'animaux par groupe et la dispersion des valeurs ne permet pas d'observer de différences significatives.

Le stress oxydant a été évalué par la mesure de l'expression des gènes HO-1 et NRF-2 (Figure 30D-E). Le cisplatine induit une surexpression rénale de ces deux marqueurs. Cependant, leur expression est similaire dans les deux groupes traités (sauvage et *miR-21*$^{-/-}$). De plus, l'expression tissulaire des marqueurs de l''inflammation testés, TNF-α et IL-6 est similaire dans le modèle d'administration unique de cisplatine (Figure 30F-G). Enfin, afin d'appréhender le processus apoptotique, l'activité des caspases effectrices 3 et 7 a été dosée (Figure 31). Les souris déficientes pour miR-21 ayant reçu du cisplatine semblent présenter une activité caspases 3/7 plus élevée (194 809 ± 36 185 RLU (Relative Luminescent Unit)) que les souris sauvages ayant reçu également du cisplatine (131 271 ± 34 708 RLU) bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative.

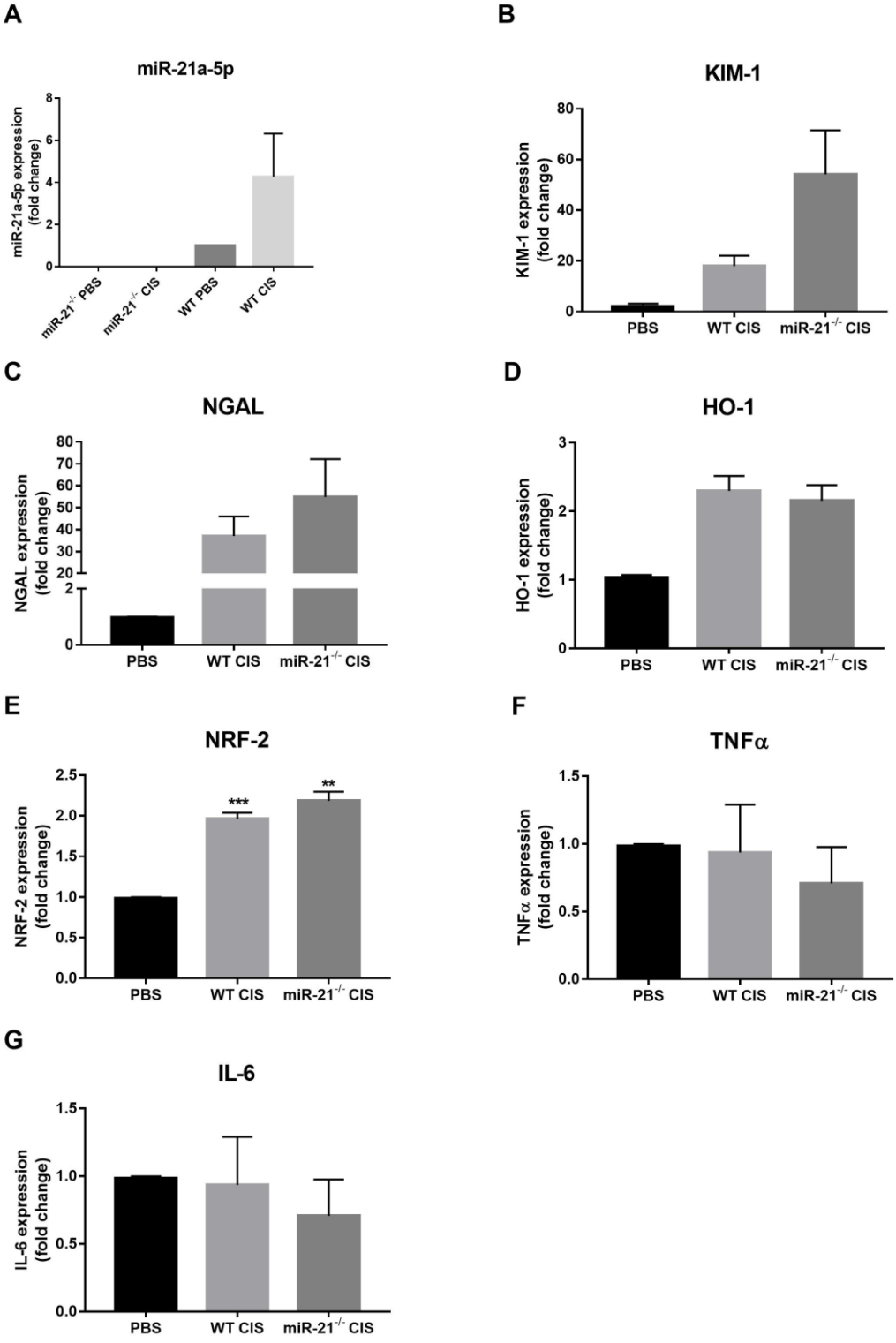


Figure 30 : Le cisplatine induit la surexpression de marqueurs de souffrance rénale. Expression rénale de miR-21 (A), KIM-1 (B), NGAL (C), HO-1 (D), NRF2 (E), TNF-α (E) et IL-6 (G) chez les souris ayant reçu une dose de 10mg/kg de cisplatine ou une injection de PBS. PBS : n = 2, WT CIS : n = 8, *miR-21*$^{-/-}$. ** p< 0,01 ***p<0,001.

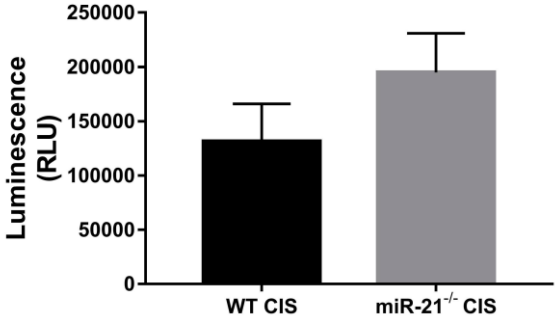


Figure 31 : Les souris déficientes pour miR-21 ont un taux d'apoptose plus élevé. Le taux d'apoptose est déterminé par mesure de l'activité des caspases 3 et 7 chez les animaux ayant reçu une dose de 10mg/kg de cisplatine. WT CIS : n = 4, *miR-21*$^{-/-}$ CIS n = 5. RLU : Relative Luminescent Unit.

ii. Protocole injections répétées de 7 mg/kg de cisplatine

Deux souris (une de phénotype sauvage et une *miR-21*$^{-/-}$) ont reçu des injections PBS jusqu'au bout du protocole. Quatorze souris (six de phénotype sauvage et huit *miR-21*$^{-/-}$) ont reçu trois injections de cisplatine (7mg/kg). Deux souris du groupe *miR-21*$^{-/-}$ ont été sacrifiées à J16 en raison d'une perte de poids importante (70% du poids initial) et de signes de souffrance. Une souris a été retrouvée décédée le jour du sacrifice à J27. La dissection de ces souris n'a pas mis en évidence d'anomalies macroscopiques majeures pouvant expliquer leur fragilité.

Comparé aux souris ayant reçu du PBS, les souris ont présenté une perte de poids significative après chaque injection de cisplatine, suivie d'une phase de récupération de durée variable (Figure 32). Plus précisément, sept jours après la première injection de cisplatine, la récupération du poids est quasiment complète : 95% ± 2,8 du poids initial pour les souris sauvages et 98,5% ±4,8 du poids initial pour les souris *miR-21*$^{-/-}$. Après une seconde injection, la récupération est plus lente. A J14 le poids moyen est à 88,3% ± 10,6 pour les souris sauvages et à 86,9% ± 13 pour les souris *miR-21*$^{-/-}$. A J21 (c'est-à-dire deux semaines après la deuxième injection), le poids est en moyenne revenu à la valeur initiale soit 99,1% ± 7,3 (souris sauvages) et 98,9% ± 8,7 (*miR-21*$^{-/-}$). Enfin à J27,

les souris ayant reçu du cisplatine ont un poids moyen de 83,1% ± 9,9 (souris sauvages) et 79,2% ± 15,4 (*miR-21*$^{-/-}$) contre 112,1% ± 3,6 pour les souris ayant reçu du PBS. Il apparait ainsi que les pertes de poids des animaux s'accroissent au fil des injections de cisplatine et ce, malgré une interruption du traitement durant 14 jours. Les courbes de poids sont par ailleurs similaires pour les souris sauvages et délétées pour miR-21.

Certains prélèvements sanguins n'ont pu être réalisés pour les souris ayant un état critique et pour les souris décédées avant le sacrifice. Un total de 10 échantillons exploitables a pu être analysé. A J27, les souris *miR-21*$^{-/-}$ ayant reçu du cisplatine ont une urée significativement plus élevée comparé aux souris sauvages ayant reçu du cisplatine (urée moyenne à 1,92 g/l ±, 0,72 *versus* 0,66 g/l ± 0,15 p = 0,014) (Figure 33). De plus, les souris sauvages ayant reçu du cisplatine ne modifient pas significativement leur urée sanguine (p=0,38). L'inhibition de miR-21 est ainsi délétère sur la fonction rénale dans ce modèle d'injections répétées de cisplatine. Cependant, ces résultats sont à modérer par le fait que les souris les plus faibles n'ont pas pu être prélevées soit au total six souris dont quatre dans le groupe *miR-21*$^{-/-}$ cisplatine et deux dans le groupe sauvage cisplatine.

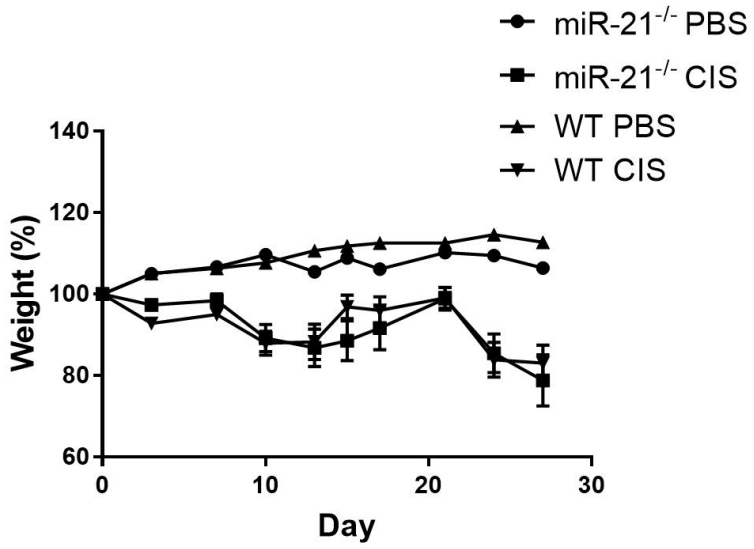


Figure 32 : Suivi du poids des animaux. Courbes de poids chez les animaux ayant reçu des doses répétées de 7 mg/kg de cisplatine ou de PBS (J0, J7, J21). PBS : n = 2 ; WT CIS : n = 6, *miR-21*$^{-/-}$: n = 8.

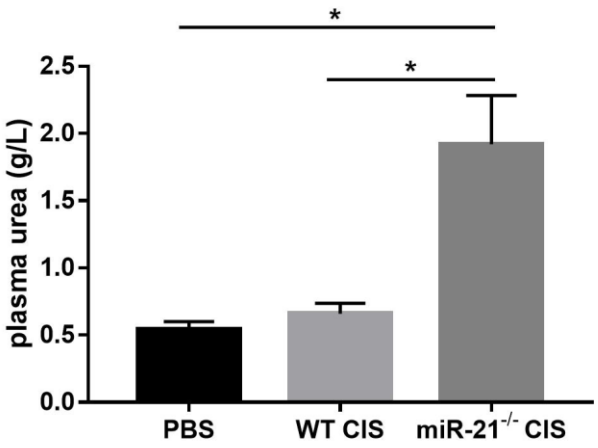


Figure 33 : Dosage plasmatique de l'urée chez les souris sauvages ou *miR-21*$^{-/-}$ ayant reçu du cisplatine ou du PBS. PBS : n = 2 ; WT CIS : n = 4, *miR-21*$^{-/-}$: n = 5. * p<0,05.

De plus, les lésions histologiques semblent plus sévères chez les souris *miR-21*$^{-/-}$. En effet, les souris ayant reçu du PBS présentent un parenchyme rénal bien conservé, avec en particulier l'absence de lésions tubulaires. Les souris ayant reçu du cisplatine montrent des lésions de nécrose tubulaire aiguë : épithélium aminci avec béance des lumières, perte de la bordure en brosse, condensation des noyaux, débris cellulaires intra-luminaux (Figure 34). De manière intéressante, les souris *miR-21*$^{-/-}$ semblent présenter des lésions plus sévères. Ces données restent à confirmer par l'évaluation quantitative du score d'atteinte tubulaire aiguë.

L'analyse des ARN tissulaires a permis de confirmer dans un premier temps que l''expression rénale de miR-21 augmente suite aux injections de cisplatine (Figure 35A). De plus, comme attendu, l'expression rénale de miR-21 n'est pas détectable pour les souris de génotype *miR-21*$^{-/-}$.

L'étude de l'expression des marqueurs de souffrance rénale NGAL et KIM-1 est en faveur d'un effet délétère de l'absence de miR-21 vis-à-vis de l'agression induite par le cisplatine (Figure 35B-C). En effet, si NGAL et KIM-1 sont surexprimés dans les deux groupes d'animaux traités, une différence significative est observée pour NGAL entre les souris sauvages et *miR-21*$^{-/-}$ (RQ = 45,4 ± 16,8 *versus* 118,1 ± 18,3 ; p = 0,02). En revanche, l'expression des marqueurs de stress oxydant (Figure 35D-E) et des marqueurs inflammatoires (Figure 35F-G) ne semble pas modulé par le statut miR-21.

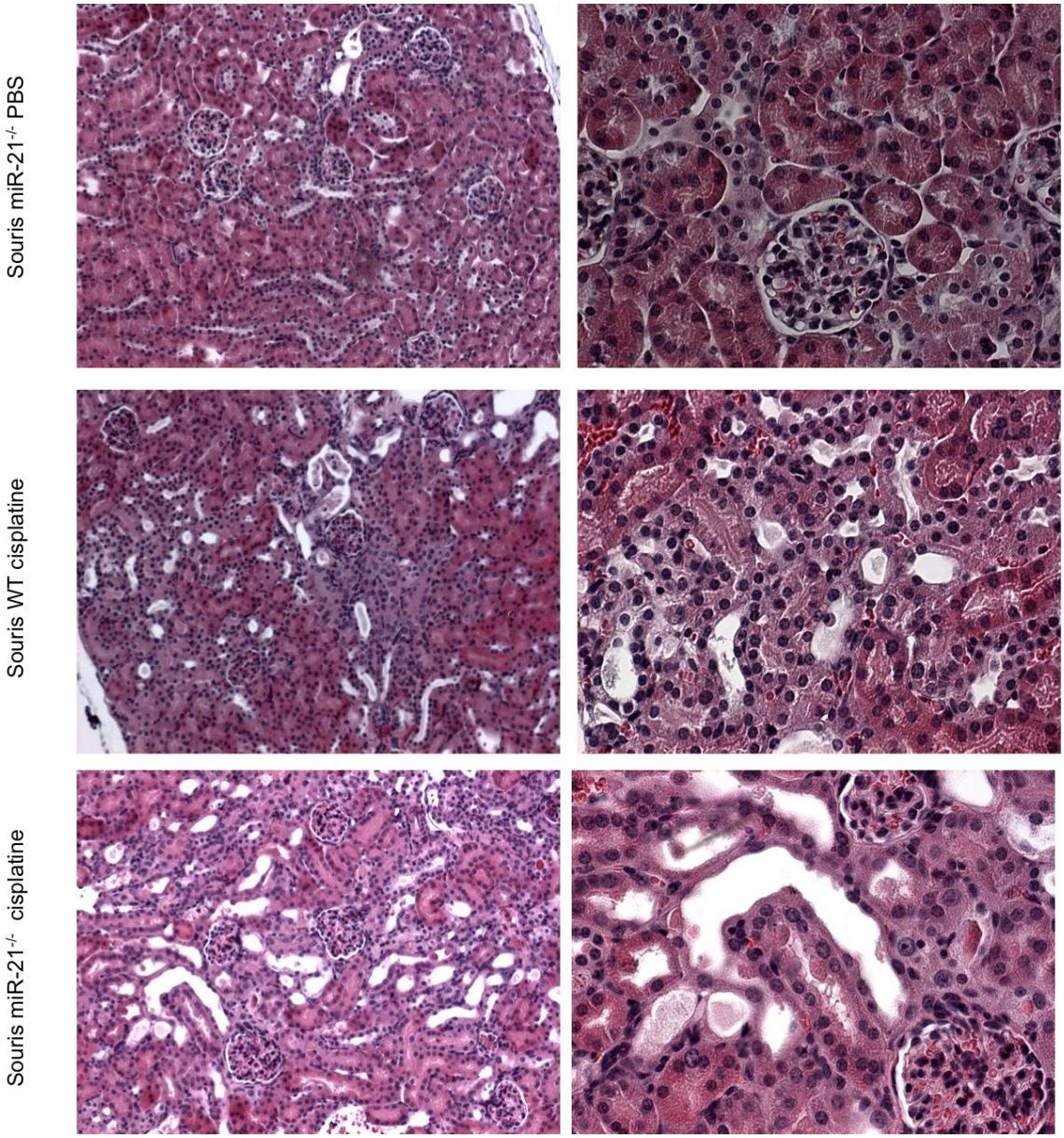


Figure 34 : Coupes histologiques des souris exposées de façon répétée au PBS ou au cisplatine. Les reins sont analysés à J27. Une coupe représentative de chaque groupe a été choisie. Coloration à l'Hematoxyline Eosine. Colonne de droite grossissement x10. Colonne de gauche grossissement x25.

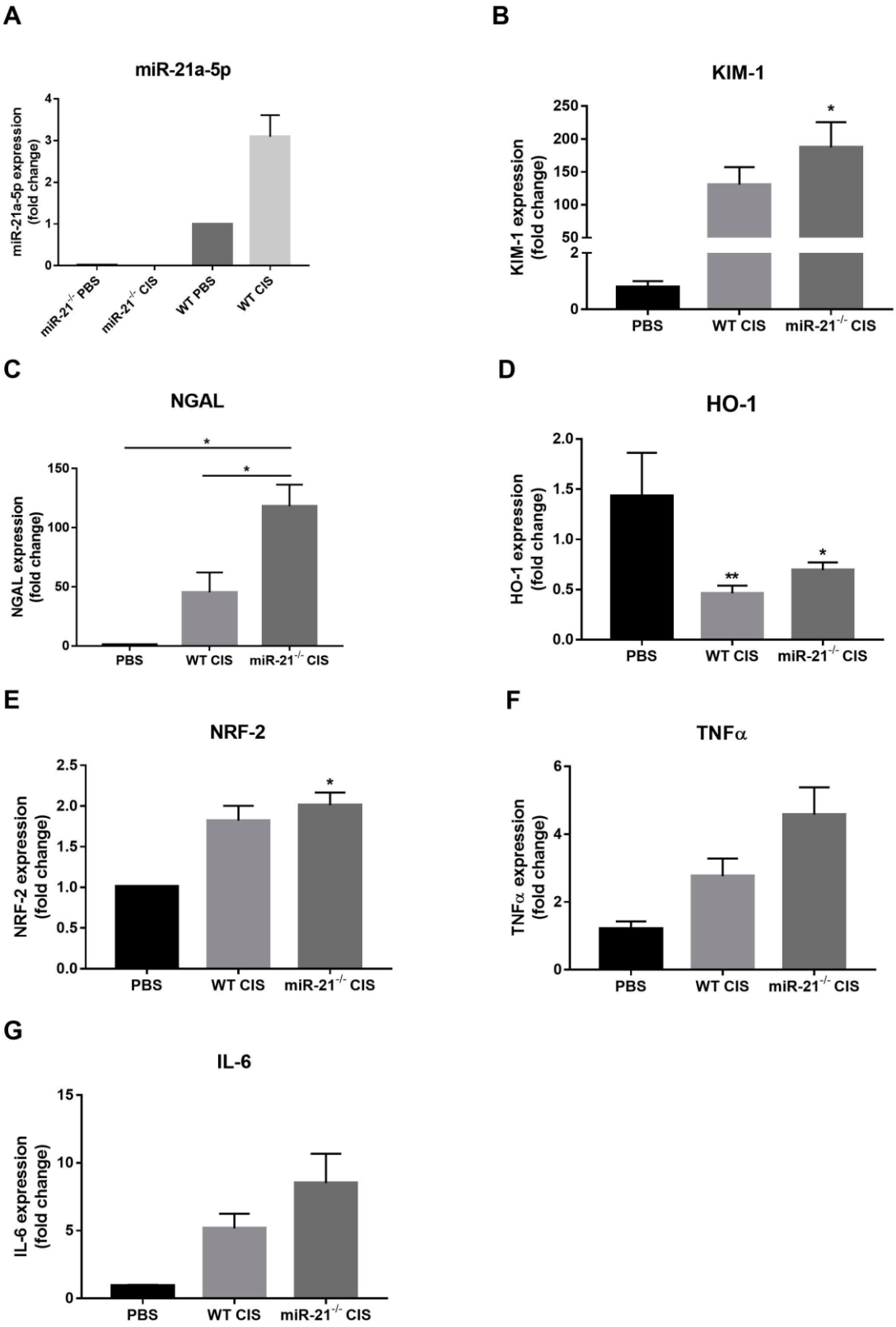


Figure 35 : Expression rénale de miR-21 et des marqueurs de souffrance rénale. Expression rénale de miR-21 (A), KIM-1 (B), NGAL (C), HO-1 (D), NRF2 (E), TNF-α (E) et IL-6 (G) chez les souris ayant reçu des doses répétées de 7 mg/kg de cisplatine ou de PBS. PBS : n = 2 ; WT CIS : n=5, *miR-21-/-* : n = 8.4. * p< 0,05 ** p<0,01.

3) Discussion

La néphrotoxicité du cisplatine est un élément limitant la prise en charge oncologique optimale des patients. Les mécanismes sous-jacents sont intriqués, comprenant principalement une toxicité épithéliale directe, des lésions vasculaires et une réponse inflammatoire (Oh et al. 2014). Ces éléments sont impliqués dans la grande majorité des agressions rénales aigues aboutissant à la NTA.

Dans ce travail, les données de biologie sanguine, d'histologie et d'expression tissulaire de marqueurs de souffrance rénale suggèrent ainsi que, dans les conditions d'administration testées, miR-21 est protecteur au cours de la néphrotoxicité au cisplatine. La toxicité de l'inhibition de miR-21 semble exacerbée quand l'exposition est prolongée et répétée. Nous avons exploré les mécanismes sous-jacents associés au cisplatine. La toxicité épithéliale directe de la molécule, évaluée par mesure de l'activité des caspases 3 et 7, est aggravée chez les souris *miR-21*$^{-/-}$ ayant reçu 10mg/kg de cisplatine. Cette mesure pourra être réalisée chez les souris ayant reçu des injections répétées. Le stress oxydant, évalué par HO-1 et NRF2, induit par le cisplatine (M. S. Park, De Leon, and Devarajan 2002) n'est pas modifié par l'absence de miR-21. De façon discordante avec les données de la littérature (Oh et al. 2014), l'inflammation (TNF-α, IL-6) n'est pas modifiée par le cisplatine dans notre modèle d'injection unique.

Ces travaux préliminaires comprennent plusieurs limites et appellent des investigations complémentaires. Notre modèle murin semble plus sensible au cisplatine que d'autres modèles décrits dans la littérature. Ainsi, une équipe a récemment montré que l'injection hebdomadaire de 7 ou 9 mg/kg de cisplatine pendant quatre semaines entraine des lésions de fibrose rénale chez la souris (fond génétique FVB/n) (Sharp et al. 2016). Dans ce protocole, la survie des souris était de 100% dans le groupe 7 mg/kg et de 90% dans le groupe 9 mg/kg. Toutefois, dans un travail mené sur des souris de fond génétique 129svJae, la dose de 7 mg/kg en injection unique avait été retenue car des doses supérieures entrainaient une forte mortalité (Oliver et al. 2010).

De plus, les souris ont présenté une forte variabilité inter-individuelle de sensibilité au cisplatine et le prélèvement sanguin n'a pas pu être effectué chez une

partie des souris ayant reçu du cisplatine (deux dans le groupe sauvage et trois dans le groupe *miR-21*$^{-/-}$), entrainant une perte de puissance des résultats. Il pourrait également être intéressant de réaliser un dosage intermédiaire de l'urée sanguine, notamment afin de déterminer si le décès prématuré des souris est lié ou non à l'insuffisance rénale. Enfin, toutes les données de PCR en temps réel devront être confirmées sur l'expression protéique par des western blot. Par ailleurs, un autre schéma d'injection, consistant en l'administration journalière de 2mg/kg de cisplatine pendant 14 jours est actuellement testé

Cette seconde partie du travail confirme que le rôle de miR-21 au cours des pathologies rénales reste très dépendant du contexte. En effet, une augmentation de miR-21 dans le tissu rénal est observée dans une grande majorité des modèles d'insuffisance rénale aiguë. Par ailleurs, nos résultats sont en accord avec les données de la littérature, plusieurs études suggérant que, dans le contexte d'une d'une agression rénale aiguë, l'augmentation de l'expression de miR-21 aurait un effet initial protecteur (Tableau 2) (Xialian Xu et al. 2012; Jia, Teng, Zou, Fang, Jiang, et al. 2013; Xiujuan Liu et al. 2015; Jiao et al. 2016; Xialian Xu et al. 2016). Parmi les six études ayant étudié l'effet d'un blocage de miR-21 dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion, seule l'étude de Chau montre que l'inhibition de miR-21 a un effet protecteur (Chau et al. 2012). La plupart de ces travaux comprennent une étape de pré-conditionnement protecteur (préconditionnement ischémique, inhalation de Xénon, injection de chlorure de Cobalt) (Xialian Xu et al. 2012; Jia, Teng, Zou, Fang, Jiang, et al. 2013; Jiao et al. 2016; Xialian Xu et al. 2016) soulignant probablement un rôle protecteur de miR-21 dans le cadre d'une agression rénale de faible intensité. Le travail montrant un effet protecteur de miR-21 en l'absence de préconditionnement (Xiujuan Liu et al. 2015) analyse les données 24h après l'ischémie, alors que le délai d'analyse est beaucoup plus long (10 jours) dans les travaux de Chau et al (Chau et al. 2012).

Afin de compléter notre modèle, il serait ainsi intéressant d'observer l'effet de l'injection d'un antagoniste de miR-21 sur les lésions induites par le cisplatine. Cette approche permettrait d'explorer plus précisément la cinétique de l'effet protecteur de miR-21, en modulant la durée d'inhibition, ainsi que le délai par rapport à la lésion initiale.

En conclusion, ces travaux sur la néphrotoxicité du cisplatine soutiennent l'hypothèse d'un effet protecteur à la phase précoce d'une agression rénale d'autant que l'agression est répétée. Ces travaux appellent des investigations complémentaires, en particulier par l'identification de cibles de miR-21 impliquées dans la réponse rénale à la toxicité du cisplatine, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués, ainsi que la chronologie et l'intrication des évènements moléculaires sous-jacents.

DISCUSSION

miR-21 est une molécule induite dans les situations de stress cellulaire. Les modèles animaux de délétion de miR-21 soutiennent qu'il ne joue pas un rôle déterminant à l'état physiologique (Androsavich et al. 2012; Chau et al. 2012). L'expression parenchymateuse de miR-21 est faible à l'état basal mais s'élève en cas d'agression tissulaire notamment rénale (Ben-Dov et al. 2012; Fiorentino et al. 2013; Glowacki et al. 2013; Bao et al. 2014; Lai et al. 2015; Wilflingseder et al. 2014; McClelland et al. 2015; Pavkovic et al. 2016; Hennino et al. 2016), cardiaque (Thum et al. 2008), ou pulmonaire (G. Liu et al. 2010).

Comme préalablement détaillé, miR-21 est impliqué en pathologie rénale à de multiples niveaux, qu'il s'agisse de lésions aiguës ou chroniques. Les cibles de miR-21 comprennent des ARNm de protéines impliquées dans de multiples phénomènes cellulaires et souvent pléiotropes. Les conséquences d'une surexpression de miR-21 sont donc très dépendantes du contexte, et probablement de la chronologie par rapport à l'agression initiale, expliquant les données contradictoires observées dans différents modèles. Toutefois, l'ensemble des des données de la littérature et de nos travaux personnels suggère que le caractère aigu ou chronique d'une lésion rénale est un élément central à prendre en compte dans la compréhension de l'implication de miR-21.

Les pathologies rénales survenant dans un contexte aigu sont principalement représentées par la nécrose tubulaire aiguë (NTA) dans les modèles animaux mais également en pathologie humaine.

En clinique, les causes sont variées souvent intriquées reposant sur deux principaux mécanismes : l'ischémie multifactorielle (hypovolémie vraie ou relative liée à un sepsis, une hémorragie...), et la iatrogénie (aminosides, iode, bloqueurs du système rénine-angiotensine, cisplatine...) (Pickkers et al. 2017). L'exploration de miR-21 au cours des situations cliniques cournates de NTA est limitée par le fait qu'une biopsie rénale est rarement réalisée, en dehors de la transplantation rénale (Pavkovic et al. 2016). Les données de la littérature en pathologie humaines, qui restent parcellaires,

sont en faveur d'une augmentation de miR-21 dans le tissu rénal, le sérum ou les urines des patients présentant une NTA (Saikumar et al. 2012; J. Du et al. 2013; Ramachandran et al. 2013; Pavkovic et al. 2016). Une seule étude a mesuré le taux circulant de miR-21 avant une chirurgie cardiaque, un événement à haut risque de survenue d'une NTA. Ce travail a montré qu'un faible taux de miR-21 circulant était prédictif d'insuffisance rénale aiguë post-opératoire (Gaede et al. 2016). De plus, les modèles animaux utilisés pour explorer la NTA reposent sur des modèles murins d'ischémie-reperfusion dans une grande majorité des études (Godwin et al. 2010; Chau et al. 2012; Xialian Xu et al. 2012; Saikumar et al. 2012; Kaucsár et al. 2013; Jia, Teng, Zou, Fang, Jiang, et al. 2013; Xiujuan Liu et al. 2015; Xiao Chen et al. 2015; Li et al. 2016b; Xialian Xu et al. 2016; Jiao et al. 2016), mais également sur l'utilisation de néphrotoxiques, principalement la gentamycine (Jia, Teng, Zou, Fang, Jiang, et al. 2013; Saikumar et al. 2012) ou le cisplatine (Pavkovic, Riefke, and Ellinger-Ziegelbauer 2014). Tous ces modèles mettent en évidence une augmentation de miR-21 dans le tissu rénal de façon précoce dès 3 heures après la procédure (Li et al. 2016b) et prolongée jusque 30 jours après la lésion (Godwin et al. 2010). L'inhibition de miR-21 au cours d'une atteinte rénale aiguë, évaluée dans des modèles d'ischémie-reperfusion exclusivement, est protectrice (Xialian Xu et al. 2012; Jia, Teng, Zou, Fang, Zhang, et al. 2013; Xiujuan Liu et al. 2015; Jiao et al. 2016; Xialian Xu et al. 2016). Une seule étude retrouve des résultats contradictoires (Chau et al. 2012). Elle diffère des autres modèles dans la mesure où elle ne comprend pas d'étape de préconditionnement protecteur avant la lésion d'ischémie-reperfusion.

Ainsi, miR-21 s'élève dès l'initiation de la réponse rénale à une agression mais joue initialement un rôle protecteur, particulièrement vis à vis d'une répétition de l'agression. miR-21 pourrait ainsi avoir un rôle initialement cicatrisant, en particulier suite à des lésions de faible intensité. Cet effet de miR-21 pourrait être médié par l'inhibition de PTEN en favorisant la prolifération des cellules tubulaires (Jia, Teng, Zou, Fang, Zhang, et al. 2013), de PDCD4 en inhibant l'apoptose des cellules tubulaires (Xialian Xu et al. 2012), de PHD2 en diminuant la réponse rénale à l'hypoxie par la voie HIF-1α et le VEGF (Jiao et al. 2016), de la voie MKK3 – MAPK – p38, entrainant ainsi la diminution de cytokines inflammatoires d'aval (TNF-α, IL-6) (Li et al. 2016b), de la thromospondine-1, elle même inhibitrice de la néoangiogenèse (Xialian Xu et al. 2016), et de Rab11A, impliqué dans la régulation du processus d'autophagie (Xiujuan Liu et al. 2015).

miR-21 est également impliqué au cours des pathologies rénales chroniques, associées à des lésions de fibrose rénale, indépendamment de l'étiologie sous-jacente.

Au cours des études menées chez l'homme, miR-21 s'élève dans le tissu rénal, le sang ou l'urine dans toutes les pathologies étudiées. Dans ce travail (Hennino et al. 2016) comme dans la majorité des cas, l'élévation de miR-21 s'associe à des lésions plus sévères (Ben-Dov et al. 2012; Glowacki et al. 2013; Bao et al. 2014; Lai et al. 2015; McClelland et al. 2015; Pezzolesi et al. 2015; Zununi Vahed et al. 2016; Chien et al. 2016). Paradoxalement, dans quelques travaux, l'élévation urinaire de miR-21 s'associe à une moindre sévérité de l'atteinte rénale (G. Wang et al. 2013; Szeto et al. 2012). Toutes ces études observationnelles ne permettent toutefois pas d'imputer de façon certaine la responsabilité de miR-21 dans les lésions rénales.

De façon similaire aux observations effectuées chez l'homme, l'augmentation de miR-21 rénal est retrouvée de façon quasi-unanime dans les différents modèles animaux de néphropathie chronique. Plusieurs modèles murins ont exploré l'effet de l'inhibition de miR-21. Une grande majorité des travaux montre un rôle délétère de miR-21 dans les néphropathies chroniques, notamment la néphropathie diabétique (Zhong et al. 2013; Jinyang Wang et al. 2013; J.-Y. Wang et al. 2014; J. Wang et al. 2015; H. Wu et al. 2016), l'obstruction urétérale unilatérale (Zarjou et al. 2011; Zhong et al. 2011; Chau et al. 2012) et le syndrome d'Alport (Gomez et al. 2015). Une seule équipes a montré un effet délétère de l'inhibition de miR-21 au cours la néphropathie diabétique (Lai et al. 2015) et sur un modèle de sclérose glomérulaire (souris transgéniques pour le TGF-ß) (Lai et al. 2015).

Ainsi, si le processus agressif du parenchyme rénal est perenne, miR-21 participe probablement au développement de lésions de fibrose. Il existe ainsi de nombreuses pistes mécanistiques pouvant expliquer l'effet délétère de miR-21 en situation chronique, bien que certaines données soient contradictoires selon le modèle utilisé. Ainsi, l'inhibition de PTEN entraine un phénotype mésenchymateux et profibrotique dans les cellules tubulaires (Bao et al. 2014; J. Chen et al. 2015) et une augmentation de la prolifération mésangiale au cours du diabète (Mahimainathan et al. 2006; Kato, Arce, and Natarajan 2009; N. Dey et al. 2011). Les modifications métaboliques associées à la

répression de PPAR-α induisent un phénotype mésenchymateux sur des cellules murines épithéliales rénales et des podocytes (Chau et al. 2012; Gomez et al. 2015). Le blocage de Reck (Chau et al. 2012) et de TIMP3 (Fiorentino et al. 2013; Lai et al. 2015) par miR-21 lève l'inhibition sur les métalloprotéases entretenant un remodelage tissulaire délétère. L'inhibition de SMAD7 active la voie pro-fibrosante du TGF-ß (Zhong et al. 2013; Lai et al. 2015). Des études complémentaires restent nécessaires afin d'explorer le mécanisme précis impliquant chaque cible inhibée par miR-21 au cours de la fibrose rénale.

Au vu du rôle de miR-21 dans des situations de néphropathies chroniques, il appartient donc à la famille des « fibromiR » (Pottier et al. 2014). En effet, mR-21 est associé à la fibrose rénale dans une large variété de pathologies, mais également à la fibrose pulmonaire (G. Liu et al. 2010) et cardiaque (Thum et al. 2008). De plus, miR-21 est évelé de façon ubiquitaire au cours de multiples cancers (Krichevsky and Gabriely 2008) et est ainsi également considéré comme un « oncomiR ». Les cibles de miR-21 mises en évidence au cours des processus néoplasiques recoupent en grande partie les cibles de miR-21 associées à la fibrose rénale. Elles sont impliquées dans des mécanismes cellulaires au cœur du processus de tumorigenèse tels que la survie cellulaire (PTAN, PDCD4, Bcl2), le métabolisme cellulaire (PTEN, PPAR-α) ou l'angiogenèse (PHD2) (Hanahan and Weinberg 2011).

I. miR-21, un biomarqueur diagnostique et pronostique pertinent ?

Si les mécanismes du rôle pathologique de miR-21 au cours d'une lésion rénale aiguë ou chronique nécessitent des investigations complémentaires, une modulation de l'expression de miR-21 dans le tissu rénal au cours d'une agression rénale est observée dans tous les modèles expérimentaux et au cours des néphropathies quelle qu'en soit étiologie. Compte tenu du relargage actif et passif de miARN dans les fluides biologiques (Xi Chen et al. 2012b), plusieurs travaux ont dès lors exploré le potentiel de miR-21 comme biomarqueur sérique ou urinaire au cours de différentes pathologies rénales, mettant en évidence des résultats plus contradictoires (Tableau 1).

Dans le cadre des néphropathies tubulaires aiguës, il est globalement observé une surexpression de miR-21. Le taux urinaire de miR-21 s'élève chez des patients porteurs

d'une insuffisance rénale aiguë par nécrose tubulaire aiguë (Saikumar et al. 2012; Ramachandran et al. 2013; Pavkovic et al. 2016). Deux études ont exploré les taux circulants de miR-21 dans le contexte d'insuffisance rénale aiguë après une chirurgie cardiaque. Un premier travail associe un taux élevé de miR-21 circulant post-opératoire à la survenue et l'aggravation d'une insuffisance rénale (J. Du et al. 2013). Dans une étude plus récente, un taux sérique bas de miR-21 avant une chirurgie cardiaque était prédictif d'une insuffisance rénale aiguë post-opératoire (Gaede et al. 2016). Plusieurs facteurs peuvent expliquer la contradiction entre ces deux études. Les prélèvements post-opératoires peuvent contenir de l'héparine injectée au cours de la procédure et ainsi modifier les résultats du dosage des miARN (Kaudewitz et al. 2013; Boeckel et al. 2013). De plus, dans le travail de Gaede et al., l'augmentation de miR-21 pourrait refléter un mécanisme de préconditionnement protecteur physiologique (Gaede et al. 2016).

Au cours de l'atteinte chronique, la situation est inverse. Ainsi, un taux élevé de miR-21 circulant est associé aux lésions de fibrose rénale chez des patients greffés rénaux (Glowacki et al. 2013) et des patients porteurs d'une néphropathie diabétique (Pezzolesi et al. 2015; Chien et al. 2016). Une étude n'a cependant pas montré d'association entre le taux circulant de miR-21 et l'évolution de la néphropathie diabétique (Olivieri et al. 2015).

La concentration urinaire de miR-21 s'élève chez des patients porteurs d'une néphropathie diabétique ou de lésions glomérulaires minimes, en comparaison avec des sujets sains (Konta et al. 2014). Une concentration urinaire élevée de miR-21 est également associée à des lésions histologiques rénales plus sévères chez des patients transplantés (Zununi Vahed et al. 2016). A l'opposé, d'autres travaux associent une augmentation de miR-21 urinaire à la présence de lésions rénales moins sévères dans la néphropathie diabétique (Szeto et al. 2012; G. Wang et al. 2013), la néphropathie hypertensive (Szeto et al. 2012) ou la néphropathie à IgA (Szeto et al. 2012; G. Wang et al. 2013).

Par cette revue de la littérature, il apparaîtqu'une agression aigue ou chronique du parenchyme rénal peut conduire à une augmentation de miR-21. Cependant, alors que dans le premier cas l'augmentation de l'expression de miR-21 est probablement

associé à des effet bénéfique, à l'inverse une augmentation de miR-21 dans le cas d'une maladie rénale chronique est problement associé à un processus actif de fibrose rénale. Dès lors, l'interprétation d'un tel biomarqeurs (quel que soit la matrice étudiée, sang ou urines) devient extrêmement délicate et ôte de la pertinence clinique. De plus, le caractère ubiquitaire de miR-21 reste une limite intrinsèque majeure à son utilisation en tant que biomarqueur. En effet, miR-21 est augmenté au cours de nombreuses pathologies cancéreuses (Pfeffer, Yang, and Pfeffer 2015), mais également au cours d'autres pathologies d'organe, particulièrment en pathologie cardio-vasculaire (Kumar et al. 2014; Tao et al. 2015; Fu et al. 2015).

Au delà de ces écueils liés au rôle ubiquitaire et bivalent de miR-21, il existe également des limites pré-analytiques importantes à l'utilisation du taux sérique de miR-21 en tant que biomarqueur.

L'hémolyse induit une grande variabilité dans la composition sérique ou plasmatique en miARN, notamment, pour certains miARN particulièrement abondants dans les hématies (Shkurnikov et al. 2016; Pizzamiglio et al. 2016). Le taux circulant sérique de miR-21 est également augmenté par l'hémolyse (travaux personnels, MacLellan et al. 2014). La qualité des échantillons est donc une nécessité absolue pour le dosage des microARN circulants. Outre un premier tri visuel, l'utilisation d'une technique de spectrométrie permet de détecter une hémolyse de faible intensité par la mise en évidence d'un pic d'absorption à 414 nm (Shah, Soon, and Marsh 2016). L'alternative est de quantifier des miARN qui ne sont pas affectés par l'hémolyse, par exemple miR-122 (MacLellan et al. 2014), miR-378 ou miR-30c (Pizzamiglio et al. 2016).

Outre l'hémolyse, la technique de prélèvement, notamment la présence d'héparine interfère avec les résultats des qPCR de façon non homogène en fonction des miARN (Kaudewitz et al. 2013; Boeckel et al. 2013). De plus, les résultats sur des échantillons de patients ayant reçu de l'héparine sont probablement modifiés. Les prélèvements sur tube sec ou EDTA sont exploitables pour la quantification des miARN circulants, sans modifier significativement les valeurs des dosages des miARN (Leidinger et al. 2015).

Les miARN utilisés comme normalisateur dans les fluides biologiques est très variable selon les travaux et conditionne la pertinence et la reproductibilité des études.

L'utilisation d'un miARN exogène issu de *C. Elegans* Cel-miR-39 est utilisée dans la majorité des publications concernant les néphropathies (J. Du et al. 2013; Pezzolesi et al. 2015; Olivieri et al. 2015; Gaede et al. 2016) mais d'autres marqueurs ont également été utilisés (Cortez et al. 2011), en particulier snoRNA U6 (Chien et al. 2016), RNU48 (Stagakis et al. 2011) ou encore miR-16 (Glowacki et al. 2013).

De plus, les mécanismes de sécrétion des miARN en pathologie sont mal connus. Ainsi, certains auteurs ont montré que les taux de miR-21 dans les fluides biologiques sont inversement corrélés aux taux tissulaires (Saikumar et al. 2012), alors que d'autres travaux ont permis de mettre en évidence une corrélation positive entre ces paramètres (J. Wang et al. 2015; Pu et al. 2016). Des travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe ont montré que miR-21 est significativement plus élevé dans le tissu rénal et le sérum de patients transplantés rénaux présentant des lésions de fibrose modérées à sévères (Glowacki et al. 2013). Toutefois, aucun travail n'a pu explorer à l'heure actuelle la corrélation chez un même patient de l'expression rénale, sérique et urinaire de miR-21.

En conclusion, l'absence de spécificité de miR-21 pour la fibrose rénale quelle que soit la néphropathie sous-jacente rend son utilisation en tant que biomarqueur diagnostique peu envisageable. Toutefois, il pourrait constituer un bon marqueur de suivi et à terme, s'intégrer dans une approche permettant d'estimer le développement d'un processus actif de fibrose rénale. Cette approche pourrait éventuellement aider à la décision clinique dans le cadre de décision de biopsies itératives de rein natif ou de greffons.

II. Potentiel thérapeutique de miR-21

Compte tenu du caractère profibrosant de miR-21, des démarches expérimentales sont actuellement menées afin d'évaluer l'effet de son blocage sur la progression de la fibrose rénale et à terme de la maladie rénale chronique. Les molécules antagonistes des microARN, ou oligonucléotides anti-sens, sont de courtes molécules, comprenant la séquence complémentaire de la séquence « seed » du miARN cible. Différentes modifications chimiques permettant de stabiliser et d'augmenter l'affinité des oligonucléotides anti-miR ont été développées (Figure 36) (Steinkraus, Toegel, and Fulga 2016). Une première modification biochimique consiste à remplacer le

groupement 2'-hydroxyle par un groupement 2'-O-méthyl, 2'-Metoxyethyl, 2′-deoxy-2′-fluoro ou 2',4'-constrained 2'-O-ethyl. Les antagomiRs sont, quant à eux, couplés au cholestérol pour favoriser la diffusion intra-cellulaire. L'incorporation d'un acide nucléique bloqué (Locked Nuclec Acid, LNA) sur le ribose augmente également la stabilité et l'affinité de la molécule (Figure 36) (Pottier et al. 2014). Ces molécules sont actives jusque 3 semaines après un schéma de trois injections quotidiennes (Thum et al. 2008). De courtes molécules LNA (8 nucléotides) ont également été développées.

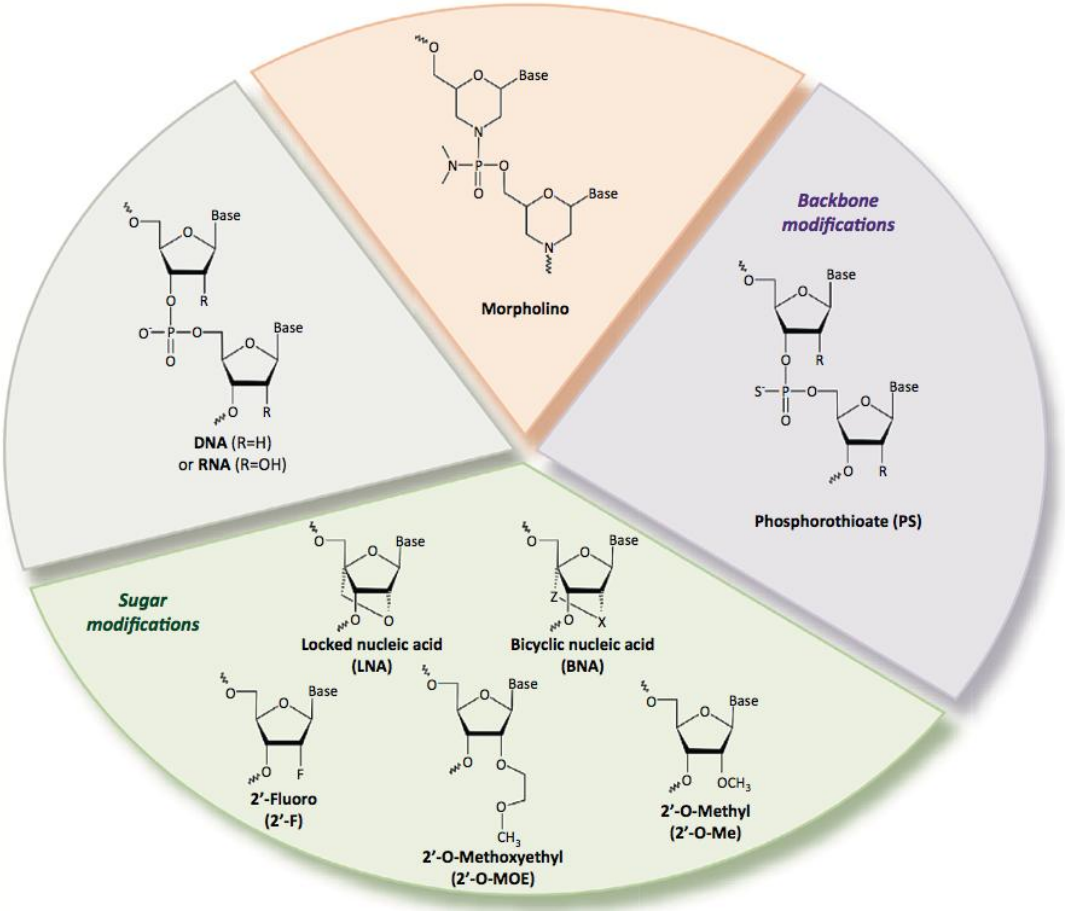


Figure 36 : Modifications chimiques améliorant la stabilité et l'affinité des antagonistes des miARN. Les modifications chimiques en position 2' du ribose comprennent le remplacement du groupement 2'-hydroxyle par un groupement 2'-O-méthyl, 2'-Metoxyethyl, 2'-deoxy-2-fluoro, ou l'incorporation d'un acide nucléique verrouillé (LNA, Locked Nucleic Acid et BNA, Bicyclic Nucleic Acid). Le squelette phosphate peut porter une modification phosphorothioate pour augmenter la résistance à la dégradation. Enfin, les morpholino comprennent un noyau triazine et des guanidines. D'après Pottier, 2014.

Les éponges à miR comprenant plusieurs sites de liaison pour le miARN d'intérêt sont également des molécules candidates. Elles présentent l'avantage d'une grande efficacité et de pouvoir inhiber une famille de miARN. Toutefois, elles nécessitent l'intégration d'une séquence codante au sein de l'organisme cible (transgenèse) et ne sont donc pour l'instant pas développées dans l'optique d'une thérapeutique chez l'Homme (Margaret S Ebert, Neilson, and Sharp 2007; Steinkraus, Toegel, and Fulga 2016).

Des stratégies plus ciblées sont également en cours de développement. Par exemple, l'utilisation de « morpholino » permet de cibler spécifiquement une séquence cible d'un ARNm et ainsi d'inhiber spécifiquement une interaction miARN-ARNm. Ces molécules sont constituées d'oligonucléotides liés à une structure en dendrimère de huit guanidines autour d'un noyau triazine qui permet une bonne diffusion en intra-cellulaire (Figure 36) (Choi, Giraldez, and Schier 2007). D'autres stratégies permettant d'améliorer le ciblage consistent à associer aux oligonucléotides modifiés des molécules d'adressage, par exemple des microparticules ß-glucanes ciblant les macrophages (Soto et al. 2012).

L'efficacité de l'inhibition de miR-21 a été étudiée dans des modèles murins de pathologies fibrosantes, notamment la fibrose cardiaque (Thum et al. 2008; Patrick et al. 2010; Thum et al. 2011; Patrick et al. 2011) et la fibrose rénale (Chau et al. 2012; Gomez et al. 2015). Cette approche a également été développée au cours de maladies inflammatoires chroniques telles le lupus systémique (Garchow et al. 2011) et le psoriasis (Guinea-Viniegra et al. 2014) (Tableau 3).

En 2008, un premier travail est mené sur l'effet de l'inhibition de miR-21 grâce à l'administration d'un antagomiR dans un modèle murin de fibrose cardiaque (hypertrophie ventriculaire gauche secondaire à une constriction aortique transverse). Le traitement réalisé immédiatement après ou dans un délai de 3 semaines après la constriction aortique permet dans les deux cas une amélioration significative des lésions cardiaques (Thum et al. 2008). Toutefois ces données ne sont pas retrouvées dans un travail de 2010 utilisant des LNA très courts (8-mer) (Patrick et al. 2010). Cette

différence pourrait s'expliquer, probablement en partie, par une moindre efficacité de ce type de molécules (Thum et al. 2011).

Deux équipes ont exploré l'efficacité d'un inhibiteur de miR-21 en prévention des lésions de fibrose rénale dans des modèles murins. Une première équipe a évalué l'impact de l'administration d'un anti-miR-21 (oligonucléotide avec liaisons phosphothiorates inter-nucléotides et modifications du sucre en 2' non précisées) sur les lésions rénales induites par une obstruction urétérale unilatérale et une ischémie-reperfusion. L'injection intra-péritonéale de l'anti-miR-21 à 20mg/kg (3 à 4 injections espacées de 3 jours selon le modèle) permet l'amélioration des lésions histologiques et de l'albuminurie (Chau et al. 2012). Une seconde équipe a développé des oligonucléotides modifiés (liaisons phosphothiorates inter-nucléotides, modifications du ribose par un groupement métoxyethyl (MOE) ou 2',4'-constrained 2'-O-ethyl (cEt) dans un modèle de néphropathie d'Alport. Dans ce modèle, l'injection sous-cutanée de25 mg/kg de façon bi-hebdomadaire pendant 1,5 à 13 semaines de l'anti-miR-21permet d'améliorer significativement les lésions rénales histologiques, les paramètres rénaux (albuminurie et fonction rénale) et la survie des souris. Ces effets bénéfiques étaient associés à une meilleure fonction mitochondriale (diminution des marqueurs de stress oxydant), probablement par le biais d'une levée d'inhibition sur PPAR-α (Gomez et al. 2015).

Les données expérimentales concernant l'inhibition de miR-21 en pathologie rénale chronique sont donc encourageantes. Concernant la tolérance de ces approches par administration d'antagoniste de miARN, l'utilisation de ces molécules est bonne dans les trois modèles murins (Chau et al. 2012; Gomez et al. 2015). L'utilisation d'un LNA-anti-miR-122 a été testée chez le primate pour le traitement du virus de l'hépatite C, montrant également une bonne tolérance de ce type de molécules (Lanford et al. 2009). Chez l'Homme, un essai thérapeutique de phase 2b a pu vérifier la tolérance et l'efficacité d'un antagoniste de miR-122 comme traitement du virus de l'hépatite C (Janssen et al. 2013). En ce qui concerne miR-21, la société Regulus développe actuellement une étude de phase 2 (Clinical Trial : NCT02855268) testant un antagoniste de miR-21 nommé RG-012 chez des patients porteurs d'un syndrome d'Alport. A ce jour, aucun résultat clinique n'est publié. Le choix du syndrome d'Alport comme pathologie relevant d'un traitement par le RG012 fait suite aux données de l'étude de Gomez *et al.* (Gomez et al. 2015). Toutefois, à notre connaissance, il n'existe

pas dans le syndrome d'Alport chez l'Homme à ce jour de données publiées sur l'association entre le niveau d'expression tissulaire rénale de miR-21 et la progression ce cette néphropathie. Au cours de la néphropathie à dépôtsmésangiaux d'IgA, nous avons pu montrer un lien significatif entre le niveau d'expression de miR-21, le pronostic fonctionnel rénal et le développement de la fibrose interstitielle. Dès lors, il pourrait être intéressant d'analyser l'effet d'un blocage de miR-21 au cours de cette pathologie. A l'inverse du syndrome d'Alport, il n'existe cependant pas de données expérimentales animales sur le blocage de miR-21 dans des modèles expérimentaux de néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA.

Tableau 3 : Modèles animaux utilisant des oligonucléotides anti-sens dirigés contre miR-21. D'après Sheedy 2015.

Modèle	Oligonucléotide	Schéma thérapeutique	Résultat	Cible	Référence	Laboratoire
Hypertrophie Ventriculaire Gauche	AntagomiR-cholestérol modified	80 mg/kg/j, 3 jours	Protection contre les lésions et la fibrose cardiaque	SPRY	(Thum, 2008)	Alnylam Pharma
	Anti-miR-sugar modified / AntagomiR	//	Protection		(Thum, 2011)	Regulus Therapeutics
	Locked Nucleic Acid (8-mer)	//	Pas de différence		(Patrick, 2010, Thum, 2011)	
Fibrose rénale	Anti-miR - backbone and sugar modified	20 mg/kg/j, 3 jours	Protection contre la fibrose interstitielle	PPAR-α	(Chau, 2012)	Regulus Therapeutics
	Anti-miR - backbone and sugar modified	25 mg/kg 2 fois/sem 3,5 à 5-16 sem	Protection contre la fibrose rénale Diminution protéinurie	PPAR-α	(Gomez, 2015)	Regulus Therapeutics
Lupus systémique	Locked Nucleic Acid (8-mer)	25 mg/kg 3 jours de suite puis 1 sem/3 (3 mois)	Protection (diminution de la splénomégalie)	PDCD4	(Garchow, 2011)	Santaris Pharma
Psoriasis	Locked Nucleic Acid (8-mer)	300 µg intradermique 7 en 15 jours	Protection	TIMP3	(Guinea-Viniegra, 2014)	Santaris Pharma

Néanmoins, compte tenu du rôle pléiotrope et du caractère ubiquitaire de miR-21, il faut s'interroger sur les effets systémiques à long terme d'un tel blocage pharmacologique. Ainsi, dans ce manuscrit, nous avons décrit des effets protecteurs de miR-21 au cours des agressions tubulaires aigues. Dès lors, on pourrait émettre l'hypothèse d'un risque accru d'insuffisance rénale aigue par nécrose tubulaire aigue sous antagoniste de miR-21.

CONCLUSION

Nos travaux ont permis de confirmer l'augmentation de miR-21 au cours d'une néphropathie chronique, la néphropathie à dépôts d'IgA. De plus, l'augmentation de miR-21 est associée à une moins bonne survie rénale, renforçant l'hypothèse d'un rôle délétère de miR-21 dans les situations chroniques menant à la fibrose. D'autre part, nous avons exploré le rôle de miR-21 dans un modèle murin de nécrose tubulaire aiguë par injection de cisplatine. Ceci a permis de mettre en évidence que l'absence de miR-21 dans cette situation est ici un élément délétère. Ces travaux s'accordent avec la majorité des études cliniques et expérimentales déjà publiées.

En conclusion, miR-21 est un miARN pléiotrope impliqué dans la réponse rénale à une agression aiguë. Bien que les modèles animaux soient discordants, miR-21 semble jouer un rôle protecteur à la phase très précoce d'une lésion rénale, en particulier en cas de lésions répétées. Son action se prolonge au-delà de la phase aigüe et entraine des effets délétères de fibrose glomérulaire et interstitielle. Les modèles d'inhibition de miR-21 *in vivo* plaident en faveur d'un bénéfice de l'inhibition de miR-21 au cours des néphropathies chroniques, faisant de ce miARN une cible thérapeutique prometteuse.

BIBLIOGRAPHIE

Abu, Nadiah, and Rahman Jamal. 2016. “Circular RNAs as Promising Biomarkers: A Mini-Review.” *Frontiers in Physiology* 7 (August). doi:10.3389/fphys.2016.00355.

Agarwal, Vikram, George W. Bell, Jin-Wu Nam, and David P. Bartel. 2015. “Predicting Effective microRNA Target Sites in Mammalian mRNAs.” *Elife* 4: e05005.

Alexiou, P., M. Maragkakis, G. L. Papadopoulos, M. Reczko, and A. G. Hatzigeorgiou. 2009. “Lost in Translation: An Assessment and Perspective for Computational microRNA Target Identification.” *Bioinformatics* 25 (23): 3049–55. doi:10.1093/bioinformatics/btp565.

Alexius-Lindgren, Michelle, Erika Andersson, Ingrid Lindstedt, and WILHELM ENGSTRÖM. 2014. “The RECK Gene and Biological Malignancy–its Significance in Angiogenesis and Inhibition of Matrix Metalloproteinases.” *Anticancer Research* 34 (8): 3867–73.

Ameres, Stefan Ludwig, Javier Martinez, and Renée Schroeder. 2007. “Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC.” *Cell* 130 (1): 101–12. doi:10.1016/j.cell.2007.04.037.

Andreucci, Michele, Teresa Faga, Antonio Pisani, Maria Perticone, and Ashour Michael. 2016. “The Ischemic/nephrotoxic Acute Kidney Injury and the Use of Renal Biomarkers in Clinical Practice.” *European Journal of Internal Medicine*, December. doi:10.1016/j.ejim.2016.12.001.

Androsavich, J. R., B. N. Chau, B. Bhat, P. S. Linsley, and N. G. Walter. 2012. “Disease-Linked microRNA-21 Exhibits Drastically Reduced mRNA Binding and Silencing Activity in Healthy Mouse Liver.” *RNA* 18 (8): 1510–26. doi:10.1261/rna.033308.112.

Appelhoff, R. J., Y.-M. Tian, R. R. Raval, H. Turley, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and J. M. Gleadle. 2004. “Differential Function of the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the Regulation of Hypoxia-Inducible Factor.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (37): 38458–65. doi:10.1074/jbc.M406026200.

Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, E. M. Kroh, I. K. Ruf, C. C. Pritchard, D. F. Gibson, P. S. Mitchell, et al. 2011. “Argonaute2 Complexes Carry a Population of Circulating microRNAs Independent of Vesicles in Human Plasma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (12): 5003–8. doi:10.1073/pnas.1019055108.

Babiarz, J. E., J. G. Ruby, Y. Wang, D. P. Bartel, and R. Blelloch. 2008. “Mouse ES Cells Express Endogenous shRNAs, siRNAs, and Other Microprocessor-Independent, Dicer-Dependent Small RNAs.” *Genes & Development* 22 (20): 2773–85. doi:10.1101/gad.1705308.

Báez-Vega, Perla M., Ileabett M. Echevarría Vargas, Fatma Valiyeva, Joel Encarnación-Rosado, Adriana Roman, Josean Flores, María J. Marcos-Martínez, and Pablo E. Vivas-Mejía. 2016. “Targeting miR-21-3p Inhibits Proliferation and Invasion of Ovarian Cancer Cells.” *Oncotarget* 7 (24): 36321–37. doi:10.18632/oncotarget.9216.

Baker, Andrew H., Dylan R. Edwards, and Gillian Murphy. 2002. "Metalloproteinase Inhibitors: Biological Actions and Therapeutic Opportunities." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 19): 3719–27.

Bao, Hao, Shuai Hu, Changming Zhang, Shaolin Shi, Weisong Qin, Caihong Zeng, Ke Zen, and Zhihong Liu. 2014. "Inhibition of miRNA-21 Prevents Fibrogenic Activation in Podocytes and Tubular Cells in IgA Nephropathy." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 444 (4): 455–60. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.065.

Bartel, David P. 2009. "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions." *Cell* 136 (2): 215–33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.

Baskerville, S. 2005. "Microarray Profiling of microRNAs Reveals Frequent Coexpression with Neighboring miRNAs and Host Genes." *RNA* 11 (3): 241–47. doi:10.1261/rna.7240905.

Bellmunt, Joaquim, Chensheng Willa Zhou, Stephanie A. Mullane, Lillian Werner, Mary-Ellen Taplin, André P. Fay, Toni K. Choueiri, et al. 2016. "Association of Tumour microRNA Profiling with Outcomes in Patients with Advanced Urothelial Carcinoma Receiving First-Line Platinum-Based Chemotherapy." *British Journal of Cancer* 115 (1): 12–19. doi:10.1038/bjc.2016.146.

Bernhardt, W. M. 2006. "Preconditional Activation of Hypoxia-Inducible Factors Ameliorates Ischemic Acute Renal Failure." *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (7): 1970–78. doi:10.1681/ASN.2005121302.

Bernstein, Emily, Sang Yong Kim, Michelle A Carmell, Elizabeth P Murchison, Heather Alcorn, Mamie Z Li, Alea A Mills, Stephen J Elledge, Kathryn V Anderson, and Gregory J Hannon. 2003. "Dicer Is Essential for Mouse Development." *Nature Genetics* 35 (3): 215–17. doi:10.1038/ng1253.

Boeckel, Jes-Niels, Claudia E. Thomé, David Leistner, Andreas M. Zeiher, Stephan Fichtlscherer, and Stefanie Dimmeler. 2013. "Heparin Selectively Affects the Quantification of microRNAs in Human Blood Samples." *Clinical Chemistry* 59 (7): 1125–27. doi:10.1373/clinchem.2012.199505.

Cai, X. 2004. "Human microRNAs Are Processed from Capped, Polyadenylated Transcripts That Can Also Function as mRNAs." *RNA* 10 (12): 1957–66. doi:10.1261/rna.7135204.

Cai, Z., H. Zhong, M. Bosch-Marce, K. Fox-Talbot, L. Wang, C. Wei, M. A. Trush, and G. L. Semenza. 2007. "Complete Loss of Ischaemic Preconditioning-Induced Cardioprotection in Mice with Partial Deficiency of HIF-1." *Cardiovascular Research* 77 (3): 463–70. doi:10.1093/cvr/cvm035.

Cao, Li, Li-Ping Kong, Zhang-Bin Yu, Shu-Ping Han, Yun-Fei Bai, Jingai Zhu, Xiaoshan Hu, Chun Zhu, Shasha Zhu, and Xi-Rong Guo. 2012. "microRNA Expression Profiling of the Developing Mouse Heart." *International Journal of Molecular Medicine* 30 (5): 1095–1104. doi:10.3892/ijmm.2012.1092.

Cattran, Daniel C., Rosanna Coppo, H. Terence Cook, John Feehally, Ian SD Roberts, Stéphan Troyanov, Charles E. Alpers, Alessandro Amore, Jonathan Barratt, and Francois Berthoux. 2009. "The Oxford Classification of IgA Nephropathy: Rationale, Clinicopathological Correlations, and Classification." *Kidney International* 76 (5): 534–45.

Cech, Thomas R., and Joan A. Steitz. 2014. “The Noncoding RNA Revolution—Trashing Old Rules to Forge New Ones.” *Cell* 157 (1): 77–94. doi:10.1016/j.cell.2014.03.008.

Chau, B. N., C. Xin, J. Hartner, S. Ren, A. P. Castano, G. Linn, J. Li, et al. 2012. “MicroRNA-21 Promotes Fibrosis of the Kidney by Silencing Metabolic Pathways.” *Science Translational Medicine* 4 (121): 121ra18–121ra18. doi:10.1126/scitranslmed.3003205.

Chen, Jianguo, Anna Zmijewska, Degui Zhi, and Roslyn B. Mannon. 2015. “Cyclosporine-Mediated Allograft Fibrosis Is Associated with Micro-RNA-21 through AKT Signaling.” *Transplant International* 28 (2): 232–45. doi:10.1111/tri.12471.

Chen, Po Yu, Heiko Manninga, Krasimir Slanchev, Minchen Chien, James J. Russo, Jingyue Ju, Robert Sheridan, et al. 2005. “The Developmental miRNA Profiles of Zebrafish as Determined by Small RNA Cloning.” *Genes & Development* 19 (11): 1288–93.

Chen, Xi, Hongwei Liang, Junfeng Zhang, Ke Zen, and Chen-Yu Zhang. 2012a. “Horizontal Transfer of microRNAs: Molecular Mechanisms and Clinical Applications.” *Protein & Cell* 3 (1): 28–37. doi:10.1007/s13238-012-2003-z.

Chen, Liang, Zhang, Zen, Zhang. 2012b. “Secreted microRNAs: A New Form of Intercellular Communication.” *Trends in Cell Biology* 22 (3): 125–32. doi:10.1016/j.tcb.2011.12.001.

Chen, Xiao, Cen-Cen Wang, Shu-Min Song, Shi-Yao Wei, Jian-Si Li, Shi-Lei Zhao, and Bing Li. 2015. “The Administration of Erythropoietin Attenuates Kidney Injury Induced by Ischemia/reperfusion with Increased Activation of Wnt/β-Catenin Signaling.” *Journal of the Formosan Medical Association* 114 (5): 430–37. doi:10.1016/j.jfma.2015.01.007.

Chen, Yanni, Junbo Chen, Hui Wang, Jingjing Shi, Kailang Wu, Shi Liu, Yingle Liu, and Jianguo Wu. 2013. “HCV-Induced miR-21 Contributes to Evasion of Host Immune System by Targeting MyD88 and IRAK1.” Edited by Charles M. Rice. *PLoS Pathogens* 9 (4): e1003248. doi:10.1371/journal.ppat.1003248.

Chen, Ying, Yanping Gao, Kai Zhang, Chen Li, Yan Pan, Jing Chen, Rui Wang, and Longbang Chen. 2015. “MicroRNAs as Regulators of Cisplatin Resistance in Lung Cancer.” *Cellular Physiology and Biochemistry* 37 (5): 1869–80. doi:10.1159/000438548.

Chen, Yonghua, Cheng Li, Chunlu Tan, and Xubao Liu. 2016. “Circular RNAs: A New Frontier in the Study of Human Diseases.” *Journal of Medical Genetics* 53 (6): 359–65. doi:10.1136/jmedgenet-2016-103758.

Cheng, Y., P. Zhu, J. Yang, X. Liu, S. Dong, X. Wang, B. Chun, J. Zhuang, and C. Zhang. 2010. “Ischaemic Preconditioning-Regulated miR-21 Protects Heart against Ischaemia/reperfusion Injury via Anti-Apoptosis through Its Target PDCD4.” *Cardiovascular Research* 87 (3): 431–39. doi:10.1093/cvr/cvq082.

Chi, Sung Wook, Julie B. Zang, Aldo Mele, and Robert B. Darnell. 2009. “Argonaute HITS-CLIP Decodes microRNA–mRNA Interaction Maps.” *Nature*, June. doi:10.1038/nature08170.

Chien, Hung-Yu, Chang-Yi Chen, Yen-Hui Chiu, Yi-Chun Lin, and Wan-Chun Li. 2016. “Differential microRNA Profiles Predict Diabetic Nephropathy Progression in

Taiwan." *International Journal of Medical Sciences* 13 (6): 457–65. doi:10.7150/ijms.15548.

Chinenov, Yurii, and Tom K. Kerppola. 2001. "Close Encounters of Many Kinds: Fos-Jun Interactions That Mediate Transcription Regulatory Specificity." *Oncogene* 20 (19): 2438–52.

Choi, W.-Y., A. J. Giraldez, and A. F. Schier. 2007. "Target Protectors Reveal Dampening and Balancing of Nodal Agonist and Antagonist by miR-430." *Science* 318 (5848): 271–74. doi:10.1126/science.1147535.

Chung, Arthur C.-K., and Hui Y. Lan. 2015. "MicroRNAs in Renal Fibrosis." *Frontiers in Physiology* 6 (February). doi:10.3389/fphys.2015.00050.

Ciarimboli, Giuliano. 2014. "Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Side-Effects." *Anticancer Research* 34 (1): 547–50.

Cooke, A., A. Prigge, and M. Wickens. 2010. "Translational Repression by Deadenylases." *Journal of Biological Chemistry* 285 (37): 28506–13. doi:10.1074/jbc.M110.150763.

Cortez, Maria Angelica, Carlos Bueso-Ramos, Jana Ferdin, Gabriel Lopez-Berestein, Anil K. Sood, and George A. Calin. 2011. "MicroRNAs in Body Fluids—the Mix of Hormones and Biomarkers." *Nature Reviews Clinical Oncology* 8 (8): 467–77. doi:10.1038/nrclinonc.2011.76.

Croce, Carlo M., and George A. Calin. 2005. "miRNAs, Cancer, and Stem Cell Division." *Cell* 122 (1): 6–7. doi:10.1016/j.cell.2005.06.036.

Czabotar, Peter E., Guillaume Lessene, Andreas Strasser, and Jerry M. Adams. 2013. "Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (1): 49–63. doi:10.1038/nrm3722.

D'Amico, Giuseppe. 2004. "Natural History of Idiopathic IgA Nephropathy and Factors Predictive of Disease Outcome." *Seminars in Nephrology* 24 (3): 179–96. doi:10.1016/j.semnephrol.2004.01.001.

Davis, B. N., and A. Hata. 2010. "Mechanisms of Control of microRNA Biogenesis." *Journal of Biochemistry*, September. doi:10.1093/jb/mvq096.

Davis, Brandi N., Aaron C. Hilyard, Giorgio Lagna, and Akiko Hata. 2008. "SMAD Proteins Control DROSHA-Mediated microRNA Maturation." *Nature* 454 (7200): 56–61. doi:10.1038/nature07086.

Davis, R. J. 1994. "MAPKs: New JNK Expands the Group." *Trends in Biochemical Sciences* 19 (11): 470–73.

Denby, Laura, Vasudev Ramdas, Martin W. McBride, Joe Wang, Hollie Robinson, John McClure, Wendy Crawford, et al. 2011. "miR-21 and miR-214 Are Consistently Modulated during Renal Injury in Rodent Models." *The American Journal of Pathology* 179 (2): 661–72. doi:10.1016/j.ajpath.2011.04.021.

Denli, Ahmet M., Bastiaan BJ Tops, Ronald HA Plasterk, René F. Ketting, and Gregory J. Hannon. 2004. "Processing of Primary microRNAs by the Microprocessor Complex." *Nature* 432 (7014): 231–35.

Dey, N., F. Das, M. M. Mariappan, C. C. Mandal, N. Ghosh-Choudhury, B. S. Kasinath, and G. G. Choudhury. 2011. "MicroRNA-21 Orchestrates High Glucose-Induced Signals to TOR Complex 1, Resulting in Renal Cell Pathology in Diabetes." *Journal of Biological Chemistry* 286 (29): 25586–603. doi:10.1074/jbc.M110.208066.

Dey, Nirmalya, Nandini Ghosh-Choudhury, Balakuntalam S. Kasinath, and Goutam Ghosh Choudhury. 2012. "TGFβ-Stimulated MicroRNA-21 Utilizes PTEN to Orchestrate AKT/mTORC1 Signaling for Mesangial Cell Hypertrophy and Matrix Expansion." Edited by Effie C. Tsilibary. *PLoS ONE* 7 (8): e42316. doi:10.1371/journal.pone.0042316.

Diep, Cuong Q., Dongdong Ma, Rahul C. Deo, Teresa M. Holm, Richard W. Naylor, Natasha Arora, Rebecca A. Wingert, et al. 2011. "Identification of Adult Nephron Progenitors Capable of Kidney Regeneration in Zebrafish." *Nature* 470 (7332): 95–100. doi:10.1038/nature09669.

Donadio, James V., and Joseph P. Grande. 2002. "IgA Nephropathy." *New England Journal of Medicine* 347 (10): 738–48.

Dong, Jie, Yu-Pei Zhao, Li Zhou, Tai-Ping Zhang, and Ge Chen. 2011. "Bcl-2 Upregulation Induced by miR-21 Via a Direct Interaction Is Associated with Apoptosis and Chemoresistance in MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cells." *Archives of Medical Research* 42 (1): 8–14. doi:10.1016/j.arcmed.2011.01.006.

Ben-Dov, Iddo Z., Thangamani Muthukumar, Pavel Morozov, Franco B. Mueller, Thomas Tuschl, and Manikkam Suthanthiran. 2012. "MicroRNA Sequence Profiles of Human Kidney Allografts With or Without Tubulointerstitial Fibrosis:" *Transplantation Journal* 94 (11): 1086–94. doi:10.1097/TP.0b013e3182751efd.

Du, Changsheng, Chang Liu, Jiuhong Kang, Guixian Zhao, Zhiqiang Ye, Shichao Huang, Zhenxin Li, Zhiying Wu, and Gang Pei. 2009. "MicroRNA miR-326 Regulates TH-17 Differentiation and Is Associated with the Pathogenesis of Multiple Sclerosis." *Nature Immunology* 10 (12): 1252–59. doi:10.1038/ni.1798.

Du, Juan, Xiaoqing Cao, Liang Zou, Yi Chen, Jin Guo, Zujun Chen, Shengshou Hu, and Zhe Zheng. 2013. "MicroRNA-21 and Risk of Severe Acute Kidney Injury and Poor Outcomes after Adult Cardiac Surgery." Edited by Sabato D'Auria. *PLoS ONE* 8 (5): e63390. doi:10.1371/journal.pone.0063390.

Ebert, M. S., and P. A. Sharp. 2010. "MicroRNA Sponges: Progress and Possibilities." *RNA* 16 (11): 2043–50. doi:10.1261/rna.2414110.

Ebert, Margaret S, Joel R Neilson, and Phillip A Sharp. 2007. "MicroRNA Sponges: Competitive Inhibitors of Small RNAs in Mammalian Cells." *Nature Methods* 4 (9): 721–26. doi:10.1038/nmeth1079.

Ebert, Margaret S., and Phillip A. Sharp. 2012. "Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes." *Cell* 149 (3): 515–24. doi:10.1016/j.cell.2012.04.005.

Eichhorn, Stephen W., Huili Guo, Sean E. McGeary, Ricard A. Rodriguez-Mias, Chanseok Shin, Daehyun Baek, Shu-hao Hsu, Kalpana Ghoshal, Judit Villén, and David P. Bartel. 2014. "mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues." *Molecular Cell* 56 (1): 104–15. doi:10.1016/j.molcel.2014.08.028.

Eknoyan, Garabed, Norbert Lameire, Kai-Uwe Eckardt, Bertram L. Kasiske, Omar I. Abboud, Sharon Adler, FASN Rajiv Agarwal, et al. 2012. "KDIGO Board Members." *Kidney International* 2: 3.

Eulalio, A., F. Tritschler, and E. Izaurralde. 2009. "The GW182 Protein Family in Animal Cells: New Insights into Domains Required for miRNA-Mediated Gene Silencing." *RNA* 15 (8): 1433–42. doi:10.1261/rna.1703809.

Fiers, Walter, Rudi Beyaert, Wim Declercq, and Peter Vandenabeele. 1999. "More than One Way to Die: Apoptosis, Necrosis and Reactive Oxygen Damage." *Oncogene* 18 (54): 7719–30.

Finck, Brian N., John J. Lehman, Teresa C. Leone, Michael J. Welch, Michael J. Bennett, Attila Kovacs, Xianlin Han, et al. 2002. "The Cardiac Phenotype Induced by PPARα Overexpression Mimics That Caused by Diabetes Mellitus." *Journal of Clinical Investigation* 109 (1): 121–30. doi:10.1172/JCI200214080.

Fiorentino, Loredana, Michele Cavalera, Maria Mavilio, Francesca Conserva, Rossella Menghini, Loreto Gesualdo, and Massimo Federici. 2013. "Regulation of TIMP3 in Diabetic Nephropathy: A Role for microRNAs." *Acta Diabetologica* 50 (6): 965–69. doi:10.1007/s00592-013-0492-8.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. "Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in Caenorhabditis Elegans." *Nature* 391 (6669): 806–11. doi:10.1038/35888.

Franco-Zorrilla, José Manuel, Adrián Valli, Marco Todesco, Isabel Mateos, María Isabel Puga, Ignacio Rubio-Somoza, Antonio Leyva, Detlef Weigel, Juan Antonio García, and Javier Paz-Ares. 2007. "Target Mimicry Provides a New Mechanism for Regulation of microRNA Activity." *Nature Genetics* 39 (8): 1033–37. doi:10.1038/ng2079.

Friedman, R. C., K. K.-H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel. 2008. "Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of microRNAs." *Genome Research* 19 (1): 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108.

Friedman, Scott L., Dean Sheppard, Jeremy S. Duffield, and Shelia Violette. 2013. "Therapy for Fibrotic Diseases: Nearing the Starting Line." *Science Translational Medicine* 5 (167): 167sr1–167sr1.

Fu, Xian-ming, Yang-zhao Zhou, Zhao Cheng, Xiao-bo Liao, and Xin-min Zhou. 2015. "MicroRNAs: Novel Players in Aortic Aneurysm." *BioMed Research International* 2015: 1–9. doi:10.1155/2015/831641.

Fujita, Shuji, Taiji Ito, Taketoshi Mizutani, Shigeru Minoguchi, Nobutake Yamamichi, Kouhei Sakurai, and Hideo Iba. 2008. "miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism." *Journal of Molecular Biology* 378 (3): 492–504. doi:10.1016/j.jmb.2008.03.015.

Fukaya, Takashi, and Yukihide Tomari. 2012. "MicroRNAs Mediate Gene Silencing via Multiple Different Pathways in Drosophila." *Molecular Cell* 48 (6): 825–36. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.024.

Fukuda, Toru, Kaoru Yamagata, Sally Fujiyama, Takahiro Matsumoto, Iori Koshida, Kimihiro Yoshimura, Masatomo Mihara, et al. 2007. "DEAD-Box RNA Helicase

Subunits of the Drosha Complex Are Required for Processing of rRNA and a Subset of microRNAs." *Nature Cell Biology* 9 (5): 604–11. doi:10.1038/ncb1577.

Gaede, Luise, Christoph Liebetrau, Johannes Blumenstein, Christian Troidl, Oliver Dörr, Won-Keun Kim, Karl Gottfried, et al. 2016. "Plasma microRNA-21 for the Early Prediction of Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Major Cardiac Surgery." *Nephrology Dialysis Transplantation* 31 (5): 760–66. doi:10.1093/ndt/gfw007.

Garchow, Barry G., Oscar Bartulos Encinas, Yiu Tak Leung, Patricia Y. Tsao, Robert A. Eisenberg, Roberto Caricchio, Susanna Obad, Andreas Petri, Sakari Kauppinen, and Marianthi Kiriakidou. 2011. "Silencing of microRNA-21 *in Vivo* Ameliorates Autoimmune Splenomegaly in Lupus Mice: miR-21 in SLE." *EMBO Molecular Medicine* 3 (10): 605–15. doi:10.1002/emmm.201100171.

Ghildiyal, Megha, and Phillip D. Zamore. 2009. "Small Silencing RNAs: An Expanding Universe." *Nature Reviews Genetics* 10 (2): 94–108. doi:10.1038/nrg2504.

Gibbings, Derrick J., Constance Ciaudo, Mathieu Erhardt, and Olivier Voinnet. 2009. "Multivesicular Bodies Associate with Components of miRNA Effector Complexes and Modulate miRNA Activity." *Nature Cell Biology* 11 (9): 1143–49. doi:10.1038/ncb1929.

Glowacki, François, Grégoire Savary, Viviane Gnemmi, David Buob, Cynthia Van der Hauwaert, Jean-Marc Lo-Guidice, Sébastien Bouyé, et al. 2013. "Increased Circulating miR-21 Levels Are Associated with Kidney Fibrosis." Edited by Jeremy Stuart Duffield. *PLoS ONE* 8 (2): e58014. doi:10.1371/journal.pone.0058014.

Godwin, J. G., X. Ge, K. Stephan, A. Jurisch, S. G. Tullius, and J. Iacomini. 2010. "Identification of a microRNA Signature of Renal Ischemia Reperfusion Injury." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (32): 14339–44. doi:10.1073/pnas.0912701107.

Gomez, Ivan G., Deidre A. MacKenna, Bryce G. Johnson, Vivek Kaimal, Allie M. Roach, Shuyu Ren, Naoki Nakagawa, et al. 2015. "Anti–microRNA-21 Oligonucleotides Prevent Alport Nephropathy Progression by Stimulating Metabolic Pathways." *Journal of Clinical Investigation* 125 (1): 141–56. doi:10.1172/JCI75852.

Gomez, Ivan G., Naoki Nakagawa, and Jeremy S. Duffield. 2016. "MicroRNAs as Novel Therapeutic Targets to Treat Kidney Injury and Fibrosis." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 310 (10): F931–F944. doi:10.1152/ajprenal.00523.2015.

Graves, B. J., and J. M. Petersen. 1998. "Specificity within the Ets Family of Transcription Factors." *Advances in Cancer Research* 75: 1–55.

Grimson, Andrew, Kyle Kai-How Farh, Wendy K. Johnston, Philip Garrett-Engele, Lee P. Lim, and David P. Bartel. 2007. "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing." *Molecular Cell* 27 (1): 91–105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017.

Guinea-Viniegra, Juan, María Jiménez, Helia B. Schonthaler, Raquel Navarro, Yolanda Delgado, María José Concha-Garzón, Erwin Tschachler, Susanna Obad, Esteban Daudén, and Erwin F. Wagner. 2014. "Targeting miR-21 to Treat Psoriasis." *Science Translational Medicine* 6 (225): 225re1. doi:10.1126/scitranslmed.3008089.

Ha, Minju, and V. Narry Kim. 2014. “Regulation of microRNA Biogenesis.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (8): 509–24. doi:10.1038/nrm3838.

Han, J. 2004. “The Drosha-DGCR8 Complex in Primary microRNA Processing.” *Genes & Development* 18 (24): 3016–27. doi:10.1101/gad.1262504.

Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The Next Generation.” *Cell* 144 (5): 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hannun, Y. A., and L. M. Obeid. 2002. “The Ceramide-Centric Universe of Lipid-Mediated Cell Regulation: Stress Encounters of the Lipid Kind.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 25847–50. doi:10.1074/jbc.R200008200.

Hartmann, Jörg Thomas, and Hans-Peter Lipp. 2003. “Toxicity of Platinum Compounds.” *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 4 (6): 889–901. doi:10.1517/14656566.4.6.889.

Harvey, S. J., G. Jarad, J. Cunningham, S. Goldberg, B. Schermer, B. D. Harfe, M. T. McManus, T. Benzing, and J. H. Miner. 2008. “Podocyte-Specific Deletion of Dicer Alters Cytoskeletal Dynamics and Causes Glomerular Disease.” *Journal of the American Society of Nephrology* 19 (11): 2150–58. doi:10.1681/ASN.2008020233.

Hatley, Mark E., David M. Patrick, Matthew R. Garcia, James A. Richardson, Rhonda Bassel-Duby, Eva van Rooij, and Eric N. Olson. 2010. “Modulation of K-Ras-Dependent Lung Tumorigenesis by MicroRNA-21.” *Cancer Cell* 18 (3): 282–93. doi:10.1016/j.ccr.2010.08.013.

Hauwaert, Cynthia Van der, Grégoire Savary, Marie-Flore Hennino, Nicolas Pottier, François Glowacki, and Christelle Cauffiez. 2015. “Implication Des microARN Dans La Fibrose Rénale.” *Néphrologie & Thérapeutique* 11 (6): 474–82.

Hayashi, Toru, Noriko Koyama, Yukio Azuma, and Masanori Kashimata. 2011. “Mesenchymal miR-21 Regulates Branching Morphogenesis in Murine Submandibular Gland in Vitro.” *Developmental Biology* 352 (2): 299–307. doi:10.1016/j.ydbio.2011.01.030.

Hennino, Marie-Flore, David Buob, Cynthia Van der Hauwaert, Viviane Gnemmi, Zacharie Jomaa, Nicolas Pottier, Grégoire Savary, et al. 2016. “miR-21-5p Renal Expression Is Associated with Fibrosis and Renal Survival in Patients with IgA Nephropathy.” *Scientific Reports* 6 (1). doi:10.1038/srep27209.

Herrera-Pérez, Zeneida, Norbert Gretz, and Harsh Dweep. 2016. “A Comprehensive Review on the Genetic Regulation of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity.” *Current Genomics* 17 (3): 279–93. doi:10.2174/1389202917666160202220555.

Ho, J., K. H. Ng, S. Rosen, A. Dostal, R. I. Gregory, and J. A. Kreidberg. 2008. “Podocyte-Specific Loss of Functional MicroRNAs Leads to Rapid Glomerular and Tubular Injury.” *Journal of the American Society of Nephrology* 19 (11): 2069–75. doi:10.1681/ASN.2008020162.

Ho, J., P. Pandey, T. Schatton, S. Sims-Lucas, M. Khalid, M. H. Frank, S. Hartwig, and J. A. Kreidberg. 2011. “The Pro-Apoptotic Protein Bim Is a MicroRNA Target in Kidney Progenitors.” *Journal of the American Society of Nephrology* 22 (6): 1053–63. doi:10.1681/ASN.2010080841.

Hoppe, Beate, Stefan Pietsch, Martin Franke, Sven Engel, Marco Groth, Matthias Platzer, and Christoph Englert. 2015. “MiR-21 Is Required for Efficient Kidney

Regeneration in Fish." *BMC Developmental Biology* 15: 43. doi:10.1186/s12861-015-0089-2.

Horita, H. N., P. A. Simpson, A. Ostriker, S. Furgeson, V. Van Putten, M. C. M. Weiser-Evans, and R. A. Nemenoff. 2011. "Serum Response Factor Regulates Expression of Phosphatase and Tensin Homolog Through a MicroRNA Network in Vascular Smooth Muscle Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (12): 2909–19. doi:10.1161/ATVBAHA.111.233585.

Hugo, Christian, and Christoph Daniel. 2009. "Thrombospondin in Renal Disease." *Nephron Experimental Nephrology* 111 (3): e61–e66. doi:10.1159/000198235.

Hunter, Melissa Piper, Noura Ismail, Xiaoli Zhang, Baltazar D. Aguda, Eun Joo Lee, Lianbo Yu, Tao Xiao, et al. 2008. "Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles." Edited by Yuk Ming Dennis Lo. *PLoS ONE* 3 (11): e3694. doi:10.1371/journal.pone.0003694.

Huntzinger, Eric, and Elisa Izaurralde. 2011. "Gene Silencing by microRNAs: Contributions of Translational Repression and mRNA Decay." *Nature Reviews Genetics* 12 (2): 99–110. doi:10.1038/nrg2936.

Iguchi, Haruhisa, Nobuyoshi Kosaka, and Takahiro Ochiya. 2010. "Secretory microRNAs as a Versatile Communication Tool." *Communicative & Integrative Biology* 3 (5): 478–81. doi:10.4161/cib.3.5.12693.

Im, Heh-In, and Paul J. Kenny. 2012. "MicroRNAs in Neuronal Function and Dysfunction." *Trends in Neurosciences* 35 (5): 325–34. doi:10.1016/j.tins.2012.01.004.

Ipsaro, Jonathan J., and Leemor Joshua-Tor. 2015. "From Guide to Target: Molecular Insights into Eukaryotic RNA-Interference Machinery." *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (1): 20–28. doi:10.1038/nsmb.2931.

Ito, T., M. Yamauchi, M. Nishina, N. Yamamichi, T. Mizutani, M. Ui, M. Murakami, and H. Iba. 2001. "Identification of SWI.SNF Complex Subunit BAF60a as a Determinant of the Transactivation Potential of Fos/Jun Dimers." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (4): 2852–57. doi:10.1074/jbc.M009633200.

Janssen, Harry L.A., Hendrik W. Reesink, Eric J. Lawitz, Stefan Zeuzem, Maribel Rodriguez-Torres, Keyur Patel, Adriaan J. van der Meer, et al. 2013. "Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA." *New England Journal of Medicine* 368 (18): 1685–94. doi:10.1056/NEJMoa1209026.

Jia, Ping, Jie Teng, Jianzhou Zou, Yi Fang, Suhua Jiang, Xiaofang Yu, Alison J. Kriegel, Mingyu Liang, and Xiaoqiang Ding. 2013. "Intermittent Exposure to Xenon Protects against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity." Edited by Emmanuel A. Burdmann. *PLoS ONE* 8 (5): e64329. doi:10.1371/journal.pone.0064329.

Jia, Ping, Jie Teng, Jianzhou Zou, Yi Fang, Xiaoyan Zhang, Zeljko J. Bosnjak, Mingyu Liang, and Xiaoqiang Ding. 2013. "miR-21 Contributes to Xenon-Conferred Amelioration of Renal Ischemia–Reperfusion Injury in Mice:" *Anesthesiology* 119 (3): 621–30. doi:10.1097/ALN.0b013e318298e5f1.

Jiang, H, W Wu, M Zhang, J Li, Y Peng, T-t Miao, H Zhu, and G Xu. 2014. "Aberrant Upregulation of miR-21 in Placental Tissues of Macrosomia." *Journal of Perinatology* 34 (9): 658–63. doi:10.1038/jp.2014.58.

Jiang, Man, Kebin Liu, Jia Luo, and Zheng Dong. 2010. “Autophagy Is a Renoprotective Mechanism During in Vitro Hypoxia and in Vivo Ischemia-Reperfusion Injury.” *The American Journal of Pathology* 176 (3): 1181–92. doi:10.2353/ajpath.2010.090594.

Jiao, Xiaoyan, Xialian Xu, Jie Teng, Yi Fang, Hui Zhang, Mingyu Liang, and Xiaoqiang Ding. 2016. “miR-21 Contributes to Renal Protection by Targeting Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2 in Delayed Ischemic Preconditioning: miR-21 Targets PHD2.” *Nephrology*, March, n/a–n/a. doi:10.1111/nep.12787.

John, Bino, Anton J Enright, Alexei Aravin, Thomas Tuschl, Chris Sander, and Debora S Marks. 2004. “Human MicroRNA Targets.” Edited by James C. Carrington. *PLoS Biology* 2 (11): e363. doi:10.1371/journal.pbio.0020363.

Jonas, S., and E. Izaurralde. 2013. “The Role of Disordered Protein Regions in the Assembly of Decapping Complexes and RNP Granules.” *Genes & Development* 27 (24): 2628–41. doi:10.1101/gad.227843.113.

Jonas, Stefanie, and Elisa Izaurralde. 2015. “Towards a Molecular Understanding of microRNA-Mediated Gene Silencing.” *Nature Reviews Genetics* 16 (7): 421–33. doi:10.1038/nrg3965.

Kaelin, William G., and Peter J. Ratcliffe. 2008. “Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway.” *Molecular Cell* 30 (4): 393–402. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.009.

Kalluri, Raghu, and Robert A. Weinberg. 2009. “The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28. doi:10.1172/JCI39104.

Kapitsinou, P. P., J. Jaffe, M. Michael, C. E. Swan, K. J. Duffy, C. L. Erickson-Miller, and V. H. Haase. 2012. “Preischemic Targeting of HIF Prolyl Hydroxylation Inhibits Fibrosis Associated with Acute Kidney Injury.” *AJP: Renal Physiology* 302 (9): F1172–F1179. doi:10.1152/ajprenal.00667.2011.

Kato, M., L. Arce, and R. Natarajan. 2009. “MicroRNAs and Their Role in Progressive Kidney Diseases.” *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 4 (7): 1255–66. doi:10.2215/CJN.00520109.

Kaucsár, Tamás, Csaba Révész, Mária Godó, Tibor Krenács, Mihály Albert, Csaba Imre Szalay, László Rosivall, et al. 2013. “Activation of the miR-17 Family and miR-21 During Murine Kidney Ischemia-Reperfusion Injury.” *Nucleic Acid Therapeutics* 23 (5): 344–54. doi:10.1089/nat.2013.0438.

Kaudewitz, D., R. Lee, P. Willeit, R. McGregor, H. S. Markus, S. Kiechl, A. Zampetaki, R. F. Storey, K. M. Channon, and M. Mayr. 2013. “Impact of Intravenous Heparin on Quantification of Circulating microRNAs in Patients with Coronary Artery Disease.” *Thrombosis and Haemostasis* 110 (3): 609–15. doi:10.1160/TH13-05-0368.

Kelland, Lloyd. 2007. “The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy.” *Nature Reviews Cancer* 7 (8): 573–84. doi:10.1038/nrc2167.

Khalid, Usman, Elijah Ablorsu, Laszlo Szabo, Robert H. Jenkins, Timothy Bowen, Rafael Chavez, and Donald J. Fraser. 2016. “MicroRNA-21 (miR-21) Expression in

Hypothermic Machine Perfusate May Be Predictive of Early Outcomes in Kidney Transplantation." *Clinical Transplantation* 30 (2): 99–104. doi:10.1111/ctr.12679.

Kiryluk, Krzysztof, Yifu Li, Francesco Scolari, Simone Sanna-Cherchi, Murim Choi, Miguel Verbitsky, David Fasel, et al. 2014. "Discovery of New Risk Loci for IgA Nephropathy Implicates Genes Involved in Immunity against Intestinal Pathogens." *Nature Genetics* 46 (11): 1187–96. doi:10.1038/ng.3118.

Komatsu, Shuhei, Daisuke Ichikawa, Tsutomu Kawaguchi, Mahito Miyamae, Wataru Okajima, Takuma Ohashi, Taisuke Imamura, et al. 2016. "Circulating miR-21 as an Independent Predictive Biomarker for Chemoresistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *American Journal of Cancer Research* 6 (7): 1511.

Konta, Tsuneo, Kazunobu Ichikawa, Kazuko Suzuki, Kosuke Kudo, Hiroko Satoh, Keita Kamei, Emiko Nishidate, and Isao Kubota. 2014. "A Microarray Analysis of Urinary microRNAs in Renal Diseases." *Clinical and Experimental Nephrology* 18 (5): 711–17. doi:10.1007/s10157-013-0906-5.

Kosaka, N., H. Iguchi, Y. Yoshioka, F. Takeshita, Y. Matsuki, and T. Ochiya. 2010. "Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells." *Journal of Biological Chemistry* 285 (23): 17442–52. doi:10.1074/jbc.M110.107821.

Krichevsky, Anna M., and Galina Gabriely. 2008. "miR-21: A Small Multi-Faceted RNA." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (1): 39–53. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x.

Kumar, S., C. W. Kim, R. D. Simmons, and H. Jo. 2014. "Role of Flow-Sensitive microRNAs in Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis: Mechanosensitive Athero-miRs." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (10): 2206–16. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303425.

Kumarswamy, Regalla, Ingo Volkmann, and Thomas Thum. 2011. "Regulation and Function of miRNA-21 in Health and Disease." *RNA Biology* 8 (5): 706–13. doi:10.4161/rna.8.5.16154.

Lai, Jennifer Y., Jinghui Luo, Christopher O'Connor, Xiaohong Jing, Viji Nair, Wenjun Ju, Ann Randolph, et al. 2015. "MicroRNA-21 in Glomerular Injury." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26 (4): 805–16. doi:10.1681/ASN.2013121274.

Lakhia, Ronak, Sachin Hajarnis, Darren Williams, Karam Aboudehen, Matanel Yheskel, Chao Xing, Mark E. Hatley, Vicente E. Torres, Darren P. Wallace, and Vishal Patel. 2015. "MicroRNA-21 Aggravates Cyst Growth in a Model of Polycystic Kidney Disease." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, December. doi:10.1681/ASN.2015060634.

Landgraf, Pablo, Mirabela Rusu, Robert Sheridan, Alain Sewer, Nicola Iovino, Alexei Aravin, Sébastien Pfeffer, et al. 2007. "A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing." *Cell* 129 (7): 1401–14.

Lanford, R. E., E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen, and H. Orum. 2009. "Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection." *Science* 327 (5962): 198–201. doi:10.1126/science.1178178.

Lankat-Buttgereit, Brigitte, and Rüdiger Göke. 2009. "The Tumour Suppressor Pdcd4: Recent Advances in the Elucidation of Function and Regulation." *Biology of the Cell* 101 (6): 309–17. doi:10.1042/BC20080191.

Lasda, Erika, and Roy Parker. 2016. "Circular RNAs Co-Precipitate with Extracellular Vesicles: A Possible Mechanism for circRNA Clearance." Edited by Pierre Busson. *PLOS ONE* 11 (2): e0148407. doi:10.1371/journal.pone.0148407.

Latcha, S., E. A. Jaimes, S. Patil, I. G. Glezerman, S. Mehta, and C. D. Flombaum. 2016. "Long-Term Renal Outcomes after Cisplatin Treatment." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 11 (7): 1173–79. doi:10.2215/CJN.08070715.

Laurent, Louise C. 2008. "MicroRNAs in Embryonic Stem Cells and Early Embryonic Development." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (6a): 2181–88. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00513.x.

Lawler, P. R., and J. Lawler. 2012. "Molecular Basis for the Regulation of Angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (5): a006627–a006627. doi:10.1101/cshperspect.a006627.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. "The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14." *Cell* 75 (5): 843–54.

Lee, Yoontae, Kipyoung Jeon, Jun-Tae Lee, Sunyoung Kim, and V. Narry Kim. 2002. "MicroRNA Maturation: Stepwise Processing and Subcellular Localization." *The EMBO Journal* 21 (17): 4663–70.

Leidinger, Petra, Christina Backes, Stefanie Rheinheimer, Andreas Keller, and Eckart Meese. 2015. "Towards Clinical Applications of Blood-Borne miRNA Signatures: The Influence of the Anticoagulant EDTA on miRNA Abundance." Edited by Soheil S. Dadras. *PLOS ONE* 10 (11): e0143321. doi:10.1371/journal.pone.0143321.

Lewis, Benjamin P., I.-hung Shih, Matthew W. Jones-Rhoades, David P. Bartel, and Christopher B. Burge. 2003. "Prediction of Mammalian microRNA Targets." *Cell* 115 (7): 787–98.

Li, Zhihui, Xu Deng, Zhijuan Kang, Ying Wang, Tuanhong Xia, Niu Ding, and Yan Yin. 2016a. "Elevation of miR-21, through Targeting MKK3, May Be Involved in Ischemia Pretreatment Protection from Ischemia-Reperfusion Induced Kidney Injury." *Journal of Nephrology* 29 (1): 27–36. doi:10.1007/s40620-015-0217-x.

Lippman, A. J., C. Helson, L. Helson, and I. H. Krakoff. 1973. "Clinical Trials of Cis-Diamminedichloroplatinum (NSC-119875)." *Cancer Chemotherapy Reports* 57 (2): 191–200.

Liu, G., A. Friggeri, Y. Yang, J. Milosevic, Q. Ding, V. J. Thannickal, N. Kaminski, and E. Abraham. 2010. "miR-21 Mediates Fibrogenic Activation of Pulmonary Fibroblasts and Lung Fibrosis." *Journal of Experimental Medicine* 207 (8): 1589–97. doi:10.1084/jem.20100035.

Liu, Xiujuan, Quan Hong, Zhen Wang, Yanyan Yu, Xin Zou, and Lihong Xu. 2015. "MiR-21 Inhibits Autophagy by Targeting Rab11a in Renal Ischemia/reperfusion." *Experimental Cell Research* 338 (1): 64–69. doi:10.1016/j.yexcr.2015.08.010.

Liu, Xuhang, Dong-Yan Jin, Michael T. McManus, and Zissimos Mourelatos. 2012. "Precursor MicroRNA-Programmed Silencing Complex Assembly Pathways in Mammals." *Molecular Cell* 46 (4): 507–17. doi:10.1016/j.molcel.2012.03.010.

Liu, Yang, Honggang Nie, Kuikui Zhang, Dan Ma, Guang Yang, Zhilei Zheng, Kai Liu, Bo Yu, Changlin Zhai, and Shuang Yang. 2014. "A Feedback Regulatory Loop between HIF-1α and miR-21 in Response to Hypoxia in Cardiomyocytes." *FEBS Letters* 588 (17): 3137–46. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.067.

Liu, Youhua. 2011. "Cellular and Molecular Mechanisms of Renal Fibrosis." *Nature Reviews Nephrology* 7 (12): 684–96. doi:10.1038/nrneph.2011.149.

Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method." *Methods* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Lo, Ting-Fang, Wei-Chung Tsai, and Shui-Tein Chen. 2013. "MicroRNA-21-3p, a Berberine-Induced miRNA, Directly Down-Regulates Human Methionine Adenosyltransferases 2A and 2B and Inhibits Hepatoma Cell Growth." Edited by Matias A. Avila. *PLoS ONE* 8 (9): e75628. doi:10.1371/journal.pone.0075628.

Loboda, Agnieszka, Mateusz Sobczak, Alicja Jozkowicz, and Jozef Dulak. 2016. "TGF- β 1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation." *Mediators of Inflammation* 2016: 1–12. doi:10.1155/2016/8319283.

Loffler, D., K. Brocke-Heidrich, G. Pfeifer, C. Stocsits, J. Hackermuller, A. K. Kretzschmar, R. Burger, et al. 2007. "Interleukin-6 Dependent Survival of Multiple Myeloma Cells Involves the Stat3-Mediated Induction of microRNA-21 through a Highly Conserved Enhancer." *Blood* 110 (4): 1330–33. doi:10.1182/blood-2007-03-081133.

Lu, T. X., J. Hartner, E.-J. Lim, V. Fabry, M. K. Mingler, E. T. Cole, S. H. Orkin, B. J. Aronow, and M. E. Rothenberg. 2011. "MicroRNA-21 Limits In Vivo Immune Response-Mediated Activation of the IL-12/IFN- Pathway, Th1 Polarization, and the Severity of Delayed-Type Hypersensitivity." *The Journal of Immunology* 187 (6): 3362–73. doi:10.4049/jimmunol.1101235.

Lund, Elsebet, Stephan Güttinger, Angelo Calado, James E. Dahlberg, and Ulrike Kutay. 2004. "Nuclear Export of microRNA Precursors." *Science (New York, N.Y.)* 303 (5654): 95–98. doi:10.1126/science.1090599.

Luo, Xiaochuang, Jingyi Gu, Rongxuan Zhu, Maoxiao Feng, Xuejiao Zhu, Yumin Li, and Jia Fei. 2014. "Integrative Analysis of Differential miRNA and Functional Study of miR-21 by Seed-Targeting Inhibition in Multiple Myeloma Cells in Response to Berberine." *BMC Systems Biology* 8 (1): 1.

Ma, F. Y., G. H. Tesch, R. A. Flavell, R. J. Davis, and D. J. Nikolic-Paterson. 2007. "MKK3-p38 Signaling Promotes Apoptosis and the Early Inflammatory Response in the Obstructed Mouse Kidney." *AJP: Renal Physiology* 293 (5): F1556–F1563. doi:10.1152/ajprenal.00010.2007.

Ma, Xiaodong, Munish Kumar, Saibyasachi N. Choudhury, Lindsey E. Becker Buscaglia, Juanita R. Barker, Keerthy Kanakamedala, Mo-Fang Liu, and Yong Li. 2011. "Loss of the miR-21 Allele Elevates the Expression of Its Target Genes and Reduces Tumorigenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (25): 10144–49.

Macciò, Antonio, and Clelia Madeddu. 2013. “Cisplatin: An Old Drug with a Newfound Efficacy – from Mechanisms of Action to Cytotoxicity.” *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14 (13): 1839–57. doi:10.1517/14656566.2013.813934.

MacLellan, Sara A., Calum MacAulay, Stephen Lam, and Cathie Garnis. 2014. “Pre-Profiling Factors Influencing Serum microRNA Levels.” *BMC Clinical Pathology* 14 (1): 27.

Mahimainathan, Lenin, Falguni Das, Balachandar Venkatesan, and Goutam Ghosh Choudhury. 2006. “Mesangial Cell Hypertrophy by High Glucose Is Mediated by Downregulation of the Tumor Suppressor PTEN.” *Diabetes* 55 (7): 2115–25. doi:10.2337/db05-1326.

Maroney, Patricia A., Yang Yu, Jesse Fisher, and Timothy W. Nilsen. 2006. “Evidence That microRNAs Are Associated with Translating Messenger RNAs in Human Cells.” *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (12): 1102–7. doi:10.1038/nsmb1174.

Matera, A. Gregory, Rebecca M. Terns, and Michael P. Terns. 2007. “Non-Coding RNAs: Lessons from the Small Nuclear and Small Nucleolar RNAs.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (3): 209–20. doi:10.1038/nrm2124.

Mathieu, Ève-Lyne, Mohamed Belhocine, Lan T.M. Dao, Denis Puthier, and Salvatore Spicuglia. 2014. “Rôle Des Longs ARN Non Codants Dans Le Développement Normal et Pathologique.” *Médecine/sciences* 30 (8-9): 790–96. doi:10.1051/medsci/20143008018.

McClelland, A. D., M. Herman-Edelstein, R. Komers, J. C. Jha, C. E. Winbanks, S. Hagiwara, P. Gregorevic, P. Kantharidis, and M. E. Cooper. 2015. “miR-21 Promotes Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy by Targeting PTEN and SMAD7.” *Clinical Science* 129 (12): 1237–49. doi:10.1042/CS20150427.

McClure, Clara, Melissa B McPeak, Dima Youssef, Zhi Q Yao, Charles E McCall, and Mohamed El Gazzar. 2016. “Stat3 and C/EBPβ Synergize to Induce miR-21 and miR-181b Expression during Sepsis.” *Immunology and Cell Biology*, August. doi:10.1038/icb.2016.63.

Medina, Pedro P., Mona Nolde, and Frank J. Slack. 2010. “OncomiR Addiction in an in Vivo Model of microRNA-21-Induced Pre-B-Cell Lymphoma.” *Nature* 467 (7311): 86–90. doi:10.1038/nature09284.

Mendell, Joshua T., and Eric N. Olson. 2012. “MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease.” *Cell* 148 (6): 1172–87. doi:10.1016/j.cell.2012.02.005.

Miller, Ronald P., Raghu K. Tadagavadi, Ganesan Ramesh, and William Brian Reeves. 2010. “Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity.” *Toxins* 2 (11): 2490–2518. doi:10.3390/toxins2112490.

Mitchell, Patrick S., Rachael K. Parkin, Evan M. Kroh, Brian R. Fritz, Stacia K. Wyman, Era L. Pogosova-Agadjanyan, Amelia Peterson, et al. 2008. “Circulating microRNAs as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (30): 10513–18.

Mittelbrunn, María, Cristina Gutiérrez-Vázquez, Carolina Villarroya-Beltri, Susana González, Fátima Sánchez-Cabo, Manuel Ángel González, Antonio Bernad, and Francisco Sánchez-Madrid. 2011. “Unidirectional Transfer of microRNA-Loaded

Exosomes from T Cells to Antigen-Presenting Cells." *Nature Communications* 2 (April): 282. doi:10.1038/ncomms1285.

Moore, Michael J, Chaolin Zhang, Emily Conn Gantman, Aldo Mele, Jennifer C Darnell, and Robert B Darnell. 2014. "Mapping Argonaute and Conventional RNA-Binding Protein Interactions with RNA at Single-Nucleotide Resolution Using HITS-CLIP and CIMS Analysis." *Nature Protocols* 9 (2): 263–93. doi:10.1038/nprot.2014.012.

Moretti, Francesca, Constanze Kaiser, Agnieszka Zdanowicz-Specht, and Matthias W Hentze. 2012. "PABP and the poly(A) Tail Augment microRNA Repression by Facilitated miRISC Binding." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (6): 603–8. doi:10.1038/nsmb.2309.

Mudduluru, Giridhar, Jonahunnatha N. George- William, Santoshi Muppala, Irfan A. Asangani, Regalla Kumarswamy, Laura D. Nelson, and Heike Allgayer. 2011. "Curcumin Regulates miR-21 Expression and Inhibits Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer." *Bioscience Reports* 31 (3): 185–97. doi:10.1042/BSR20100065.

Müller, Günter, Marion Schneider, Gabriele Biemer-Daub, and Susanne Wied. 2011. "Microvesicles Released from Rat Adipocytes and Harboring Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins Transfer RNA Stimulating Lipid Synthesis." *Cellular Signalling* 23 (7): 1207–23. doi:10.1016/j.cellsig.2011.03.013.

Muller, Sébastien, Radha Raman Pandey, and Ramesh S. Pillai. 2013. "Les piARN Forgent Un Système Immunitaire Pour Le Génome." *Médecine/sciences* 29 (5): 487–94. doi:10.1051/medsci/2013295011.

Nagalakshmi, Vidya K., Qun Ren, Margaret M. Pugh, M. Todd Valerius, Andrew P. McMahon, and Jing Yu. 2011. "Dicer Regulates the Development of Nephrogenic and Ureteric Compartments in the Mammalian Kidney." *Kidney International* 79 (3): 317–30. doi:10.1038/ki.2010.385.

Nakagawa, Naoki, Cuiyan Xin, Allie M. Roach, Natalie Naiman, Stuart J. Shankland, Giovanni Ligresti, Shuyu Ren, Suzanne Szak, Ivan G. Gomez, and Jeremy S. Duffield. 2015. "Dicer1 Activity in the Stromal Compartment Regulates Nephron Differentiation and Vascular Patterning during Mammalian Kidney Organogenesis." *Kidney International* 87 (6): 1125–40. doi:10.1038/ki.2014.406.

O'Sullivan, D. 2016. "Late Effects of Chemotherapeutic Agents on Renal Function in Childhood Cancer Survivors: A Review of the Literature." *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*, June. doi:10.1007/s11845-016-1473-z.

Oh, Gi-Su, Hyung-Jin Kim, AiHua Shen, Su Bin Lee, Dipendra Khadka, Arpana Pandit, and Hong-Seob So. 2014. "Cisplatin-Induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies." *Electrolytes & Blood Pressure* 12 (2): 55. doi:10.5049/EBP.2014.12.2.55.

Okada, Chimari, Eiki Yamashita, Soo Jae Lee, Satoshi Shibata, Jun Katahira, Atsushi Nakagawa, Yoshihiro Yoneda, and Tomitake Tsukihara. 2009. "A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5957): 1275–79. doi:10.1126/science.1178705.

Oliver, T. G., K. L. Mercer, L. C. Sayles, J. R. Burke, D. Mendus, K. S. Lovejoy, M. H. Cheng, et al. 2010. "Chronic Cisplatin Treatment Promotes Enhanced Damage Repair and

Tumor Progression in a Mouse Model of Lung Cancer." *Genes & Development* 24 (8): 837–52. doi:10.1101/gad.1897010.

Olivieri, Fabiola, Liana Spazzafumo, Massimiliano Bonafè, Rina Recchioni, Francesco Prattichizzo, Fiorella Marcheselli, Luigina Micolucci, et al. 2015. "MiR-21-5p and miR-126a-3p Levels in Plasma and Circulating Angiogenic Cells: Relationship with Type 2 Diabetes Complications." *Oncotarget* 6 (34): 35372–82. doi:10.18632/oncotarget.6164.

Ong, Shao-En, Blagoy Blagoev, Irina Kratchmarova, Dan Bach Kristensen, Hanno Steen, Akhilesh Pandey, and Matthias Mann. 2002. "Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 1 (5): 376–86.

Pabla, N., and Zheng Dong. 2008. "Cisplatin Nephrotoxicity: Mechanisms and Renoprotective Strategies." *Kidney International* 73 (9): 994–1007.

Pabla, N., R. F. Murphy, K. Liu, and Z. Dong. 2008. "The Copper Transporter Ctr1 Contributes to Cisplatin Uptake by Renal Tubular Cells during Cisplatin Nephrotoxicity." *AJP: Renal Physiology* 296 (3): F505–F511. doi:10.1152/ajprenal.90545.2008.

Palamarchuk, A. 2005. "Akt Phosphorylates and Regulates Pdcd4 Tumor Suppressor Protein." *Cancer Research* 65 (24): 11282–86. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3469.

Park, Jong-Eun, Inha Heo, Yuan Tian, Dhirendra K. Simanshu, Hyeshik Chang, David Jee, Dinshaw J. Patel, and V. Narry Kim. 2011. "Dicer Recognizes the 5′ End of RNA for Efficient and Accurate Processing." *Nature* 475 (7355): 201–5. doi:10.1038/nature10198.

Park, Kwon Moo, Cornelis Kramers, Muriel Vayssier-Taussat, Ang Chen, and Joseph V. Bonventre. 2002. "Prevention of Kidney Ischemia/Reperfusion-Induced Functional Injury, MAPK and MAPK Kinase Activation, and Inflammation by Remote Transient Ureteral Obstruction." *Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 2040–49. doi:10.1074/jbc.M107525200.

Park, Moon Soo, Maryely De Leon, and Prasad Devarajan. 2002. "Cisplatin Induces Apoptosis in LLC-PK1 Cells via Activation of Mitochondrial Pathways." *Journal of the American Society of Nephrology* 13 (4): 858–65.

Pasquinelli, Amy E. 2012. "MicroRNAs and Their Targets: Recognition, Regulation and an Emerging Reciprocal Relationship." *Nature Reviews Genetics*, March. doi:10.1038/nrg3162.

Patrick, David M., Sakari Kauppinen, Eva van Rooij, and Eric N. Olson. 2011. "Response to Thum et Al." *Journal of Clinical Investigation* 121 (2): 462–63. doi:10.1172/JCI46108.

Patrick, David M., Rusty L. Montgomery, Xiaoxia Qi, Susanna Obad, Sakari Kauppinen, Joseph A. Hill, Eva van Rooij, and Eric N. Olson. 2010. "Stress-Dependent Cardiac Remodeling Occurs in the Absence of microRNA-21 in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 120 (11): 3912–16. doi:10.1172/JCI43604.

Pavkovic, Mira, Björn Riefke, and Heidrun Ellinger-Ziegelbauer. 2014. "Urinary microRNA Profiling for Identification of Biomarkers after Cisplatin-Induced Kidney Injury." *Toxicology* 324 (October): 147–57. doi:10.1016/j.tox.2014.05.005.

Pavkovic, Mira, Björn Riefke, Anna-Lena Frisk, Ina Gröticke, and Heidrun Ellinger-Ziegelbauer. 2015. "Glomerulonephritis-Induced Changes in Urinary and Kidney MicroRNA Profiles in Rats." *Toxicological Sciences* 145 (2): 348–59. doi:10.1093/toxsci/kfv053.

Pavkovic, Mira, Cassianne Robinson-Cohen, Alicia S. Chua, Oana Nicoara, Mariana Cárdenas-González, Vanesa Bijol, Krithika Ramachandran, et al. 2016. "Detection of Drug-Induced Acute Kidney Injury in Humans Using Urinary KIM-1, miR-21,-200c and-423." *Toxicological Sciences*, kfw077.

Pelaia, Girolamo, Giovanni Cuda, Alessandro Vatrella, Luca Gallelli, Michele Caraglia, Monica Marra, Alberto Abbruzzese, et al. 2005. "Mitogen-Activated Protein Kinases and Asthma." *Journal of Cellular Physiology* 202 (3): 642–53. doi:10.1002/jcp.20169.

Peyrou, M., P. E. Hanna, and A. E. Cribb. 2007. "Cisplatin, Gentamicin, and P-Aminophenol Induce Markers of Endoplasmic Reticulum Stress in the Rat Kidneys." *Toxicological Sciences* 99 (1): 346–53. doi:10.1093/toxsci/kfm152.

Pezzolesi, Marcus G., Eiichiro Satake, Kevin P. McDonnell, Melissa Major, Adam M. Smiles, and Andrzej S. Krolewski. 2015. "Circulating TGF-β1–Regulated miRNAs and the Risk of Rapid Progression to ESRD in Type 1 Diabetes." *Diabetes* 64 (9): 3285–93. doi:10.2337/db15-0116.

Pfeffer, Susan R., Chuan He Yang, and Lawrence M. Pfeffer. 2015. "The Role of miR-21 in Cancer: The Role of miR-21 In Cancer." *Drug Development Research* 76 (6): 270–77. doi:10.1002/ddr.21257.

Pickard, Mark, and Gwyn Williams. 2015. "Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA." *Genes* 6 (3): 484–99. doi:10.3390/genes6030484.

Pickkers, Peter, Marlies Ostermann, Michael Joannidis, Alexander Zarbock, Eric Hoste, Rinaldo Bellomo, John Prowle, et al. 2017. "The Intensive Care Medicine Agenda on Acute Kidney Injury." *Intensive Care Medicine*, January. doi:10.1007/s00134-017-4687-2.

Pink, R. C., K. Wicks, D. P. Caley, E. K. Punch, L. Jacobs, and D. R. Francisco Carter. 2011. "Pseudogenes: Pseudo-Functional or Key Regulators in Health and Disease?" *RNA* 17 (5): 792–98. doi:10.1261/rna.2658311.

Pink, Ryan Charles, Priya Samuel, Davide Massa, Daniel Paul Caley, Susan Ann Brooks, and David Raul Francisco Carter. 2015. "The Passenger Strand, miR-21-3p, Plays a Role in Mediating Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cells." *Gynecologic Oncology* 137 (1): 143–51. doi:10.1016/j.ygyno.2014.12.042.

Pizzamiglio, Sara, Susanna Zanutto, Chiara Ciniselli, Antonino Belfiore, Stefano Bottelli, Manuela Gariboldi, and Paolo Verderio. 2016. "A Methodological Procedure for Evaluating the Impact of Hemolysis on Circulating microRNAs." *Oncology Letters*, November. doi:10.3892/ol.2016.5452.

Poliseno, Laura, Leonardo Salmena, Jiangwen Zhang, Brett Carver, William J. Haveman, and Pier Paolo Pandolfi. 2010. "A Coding-Independent Function of Gene and Pseudogene mRNAs Regulates Tumour Biology." *Nature* 465 (7301): 1033–38. doi:10.1038/nature09144.

Polytarchou, C., D. Iliopoulos, M. Hatziapostolou, F. Kottakis, I. Maroulakou, K. Struhl, and P. N. Tsichlis. 2011. "Akt2 Regulates All Akt Isoforms and Promotes Resistance to Hypoxia through Induction of miR-21 upon Oxygen Deprivation." *Cancer Research* 71 (13): 4720–31. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0365.

Pottier, Nicolas, Christelle Cauffiez, Michael Perrais, Pascal Barbry, and Bernard Mari. 2014. "FibromiRs: Translating Molecular Discoveries into New Anti-Fibrotic Drugs." *Trends in Pharmacological Sciences* 35 (3): 119–26. doi:10.1016/j.tips.2014.01.003.

Pu, Xue-yan, Jia-ying Shen, Zhong-ping Deng, and Ze-an Zhang. 2016. "Plasma-Specific microRNA Response Induced by Acute Exposure to Aristolochic Acid I in Rats." *Archives of Toxicology*, July. doi:10.1007/s00204-016-1791-y.

Ramachandran, K., J. Saikumar, V. Bijol, J. L. Koyner, J. Qian, R. A. Betensky, S. S. Waikar, and V. S. Vaidya. 2013. "Human miRNome Profiling Identifies MicroRNAs Differentially Present in the Urine after Kidney Injury." *Clinical Chemistry* 59 (12): 1742–52. doi:10.1373/clinchem.2013.210245.

Rehwinkel, J. 2005. "A Crucial Role for GW182 and the DCP1:DCP2 Decapping Complex in miRNA-Mediated Gene Silencing." *RNA* 11 (11): 1640–47. doi:10.1261/rna.2191905.

Ribas, J., X. Ni, M. Haffner, E. A. Wentzel, A. H. Salmasi, W. H. Chowdhury, T. A. Kudrolli, et al. 2009. "miR-21: An Androgen Receptor-Regulated MicroRNA That Promotes Hormone-Dependent and Hormone-Independent Prostate Cancer Growth." *Cancer Research* 69 (18): 7165–69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1448.

Rinn, John L., Michael Kertesz, Jordon K. Wang, Sharon L. Squazzo, Xiao Xu, Samantha A. Brugmann, L. Henry Goodnough, et al. 2007. "Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs." *Cell* 129 (7): 1311–23. doi:10.1016/j.cell.2007.05.022.

Roberts, Ian SD, H. Terence Cook, Stéphan Troyanov, Charles E. Alpers, Alessandro Amore, Jonathan Barratt, Francois Berthoux, Stephen Bonsib, Jan A. Bruijn, and Daniel C. Cattran. 2009. "The Oxford Classification of IgA Nephropathy: Pathology Definitions, Correlations, and Reproducibility." *Kidney International* 76 (5): 546–56.

Rosenberg, B., L. Vancamp, and T. Krigas. 1965. "INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE." *Nature* 205 (February): 698–99.

Ruan, Q., T. Wang, V. Kameswaran, Q. Wei, D. S. Johnson, F. Matschinsky, W. Shi, and Y. H. Chen. 2011. "The microRNA-21-PDCD4 Axis Prevents Type 1 Diabetes by Blocking Pancreatic Cell Death." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (29): 12030–35. doi:10.1073/pnas.1101450108.

Saikumar, J., D. Hoffmann, T.-M. Kim, V. R. Gonzalez, Q. Zhang, P. L. Goering, R. P. Brown, et al. 2012. "Expression, Circulation, and Excretion Profile of MicroRNA-21, -155,

and -18a Following Acute Kidney Injury." *Toxicological Sciences* 129 (2): 256–67. doi:10.1093/toxsci/kfs210.

Salice, C. J., J. S. Rokous, A. S. Kane, and R. Reimschuessel. 2001. "New Nephron Development in Goldfish (Carassius Auratus) Kidneys Following Repeated Gentamicin-Induced Nephrotoxicosis." *Comparative Medicine* 51 (1): 56–59.

Samuel, Priya, Ryan Charles Pink, Susan Ann Brooks, and David RaulFrancisco Carter. 2016. "miRNAs and Ovarian Cancer: A miRiad of Mechanisms to Induce Cisplatin Drug Resistance." *Expert Review of Anticancer Therapy* 16 (1): 57–70. doi:10.1586/14737140.2016.1121107.

Sayed, D., and M. Abdellatif. 2011. "MicroRNAs in Development and Disease." *Physiological Reviews* 91 (3): 827–87. doi:10.1152/physrev.00006.2010.

Schiffer, Mario, Markus Bitzer, Ian S.D. Roberts, Jeffrey B. Kopp, Peter ten Dijke, Peter Mundel, and Erwin P. Böttinger. 2001. "Apoptosis in Podocytes Induced by TGF-B and Smad7." *Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 807–16. doi:10.1172/JCI200112367.

Sekar, Durairaj, Basam Venugopal, Punitha Sekar, and Krishnan Ramalingam. 2016. "Role of microRNA 21 in Diabetes and Associated/related Diseases." *Gene* 582 (1): 14–18. doi:10.1016/j.gene.2016.01.039.

Sequeira-Lopez, M. L. S., E. T. Weatherford, G. R. Borges, M. C. Monteagudo, E. S. Pentz, B. D. Harfe, O. Carretero, C. D. Sigmund, and R. A. Gomez. 2010. "The MicroRNA-Processing Enzyme Dicer Maintains Juxtaglomerular Cells." *Journal of the American Society of Nephrology* 21 (3): 460–67. doi:10.1681/ASN.2009090964.

Serino, G., F. Sallustio, S. N. Cox, F. Pesce, and F. P. Schena. 2012. "Abnormal miR-148b Expression Promotes Aberrant Glycosylation of IgA1 in IgA Nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology* 23 (5): 814–24. doi:10.1681/ASN.2011060567.

Shah, Jaynish S., Patsy S. Soon, and Deborah J. Marsh. 2016. "Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs." Edited by Damir Janigro. *PLOS ONE* 11 (4): e0153200. doi:10.1371/journal.pone.0153200.

Sharp, Cierra N., Mark A. Doll, Tess V. Dupre, Parag P. Shah, Marimuthu Subathra, Deanna Siow, Gavin E. Arteel, Judit Megyesi, Levi J. Beverly, and Leah J. Siskind. 2016. "Repeated Administration of Low-Dose Cisplatin in Mice Induces Fibrosis." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 310 (6): F560–F568. doi:10.1152/ajprenal.00512.2015.

Sheedy, Frederick J. 2015. "Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response." *Frontiers in Immunology* 6 (January). doi:10.3389/fimmu.2015.00019.

Shkurnikov, M. Yu., E. N. Knyazev, K. A. Fomicheva, D. S. Mikhailenko, K. M. Nyushko, E. K. Saribekyan, T. R. Samatov, and B. Ya. Alekseev. 2016. "Analysis of Plasma microRNA Associated with Hemolysis." *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 160 (6): 748–50. doi:10.1007/s10517-016-3300-y.

Simon, Noémie, and Alexandre Hertig. 2015. “Alteration of Fatty Acid Oxidation in Tubular Epithelial Cells: From Acute Kidney Injury to Renal Fibrogenesis.” *Frontiers in Medicine* 2 (August). doi:10.3389/fmed.2015.00052.

Siomi, Haruhiko, and Mikiko C. Siomi. 2010. “Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals.” *Molecular Cell* 38 (3): 323–32. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.013.

Skinner, Roderick, Annie Parry, Lisa Price, Michael Cole, Alan W. Craft, and Andrew D.J. Pearson. 2009. “Persistent Nephrotoxicity during 10-Year Follow-up after Cisplatin or Carboplatin Treatment in Childhood: Relevance of Age and Dose as Risk Factors.” *European Journal of Cancer* 45 (18): 3213–19. doi:10.1016/j.ejca.2009.06.032.

Skog, Johan, Tom Würdinger, Sjoerd van Rijn, Dimphna H. Meijer, Laura Gainche, William T. Curry, Bob S. Carter, Anna M. Krichevsky, and Xandra O. Breakefield. 2008. “Glioblastoma Microvesicles Transport RNA and Proteins That Promote Tumour Growth and Provide Diagnostic Biomarkers.” *Nature Cell Biology* 10 (12): 1470–76. doi:10.1038/ncb1800.

Small, Eric M., and Eric N. Olson. 2011. “Pervasive Roles of microRNAs in Cardiovascular Biology.” *Nature* 469 (7330): 336–42. doi:10.1038/nature09783.

Smigielska-Czepiel, Katarzyna, Anke van den Berg, Pytrick Jellema, Izabella Slezak-Prochazka, Henny Maat, Hilda van den Bos, Roelof Jan van der Lei, et al. 2013. “Dual Role of miR-21 in CD4+ T-Cells: Activation-Induced miR-21 Supports Survival of Memory T-Cells and Regulates CCR7 Expression in Naive T-Cells.” *PloS One* 8 (10): e76217.

Song, Min Sup, Leonardo Salmena, and Pier Paolo Pandolfi. 2012. “The Functions and Regulation of the PTEN Tumour Suppressor.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, April. doi:10.1038/nrm3330.

Soto, Ernesto R., Abaigeal C. Caras, Lindsey C. Kut, Melissa K. Castle, and Gary R. Ostroff. 2012. “Glucan Particles for Macrophage Targeted Delivery of Nanoparticles.” *Journal of Drug Delivery* 2012: 1–13. doi:10.1155/2012/143524.

Stagakis, E., G. Bertsias, P. Verginis, M. Nakou, M. Hatziapostolou, H. Kritikos, D. Iliopoulos, and D. T. Boumpas. 2011. “Identification of Novel microRNA Signatures Linked to Human Lupus Disease Activity and Pathogenesis: miR-21 Regulates Aberrant T Cell Responses through Regulation of PDCD4 Expression.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 70 (8): 1496–1506. doi:10.1136/ard.2010.139857.

Steinkraus, Bruno R., Markus Toegel, and Tudor A. Fulga. 2016. “Tiny Giants of Gene Regulation: Experimental Strategies for microRNA Functional Studies: Tiny Giants of Gene Regulation.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 5 (3): 311–62. doi:10.1002/wdev.223.

Stenmark, Harald. 2009. “Rab GTPases as Coordinators of Vesicle Traffic.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (8): 513–25. doi:10.1038/nrm2728.

Su, H., M. I. Trombly, J. Chen, and X. Wang. 2009. “Essential and Overlapping Functions for Mammalian Argonautes in microRNA Silencing.” *Genes & Development* 23 (3): 304–17. doi:10.1101/gad.1749809.

Szatmári, Zsuzsanna, and Miklós Sass. 2014. “The Autophagic Roles of Rab Small GTPases and Their Upstream Regulators: A Review.” *Autophagy* 10 (7): 1154–66. doi:10.4161/auto.29395.

Szeto, Cheuk-Chun, Kwan Bonnie Ching-Ha, Lai Ka-Bik, Lai Fernand Mac-Moune, Choi Paul Cheung-Lung, Wang Gang, Chow Kai-Ming, and Li Philip Kam-Tao. 2012. “Micro-RNA Expression in the Urinary Sediment of Patients with Chronic Kidney Diseases.” *Disease Markers* 33 (3): 137–44.

Takenaka, Kazumasa, Shinya Ishikawa, Yozo Kawano, Kazuhiro Yanagihara, Ryo Miyahara, Yosuke Otake, Yoko Morioka, et al. 2004. “Expression of a Novel Matrix Metalloproteinase Regulator, RECK, and Its Clinical Significance in Resected Non-Small Cell Lung Cancer.” *European Journal of Cancer* 40 (10): 1617–23. doi:10.1016/j.ejca.2004.02.028.

Talotta, F., A. Cimmino, M. R. Matarazzo, L. Casalino, G. De Vita, M. D’esposito, R. Di Lauro, and P. Verde. 2009. “An Autoregulatory Loop Mediated by miR-21 and PDCD4 Controls the AP-1 Activity in RAS Transformation.” *Oncogene* 28 (1): 73–84.

Tao, Lichan, Yihua Bei, Yanli Zhou, Junjie Xiao, and Xinli Li. 2015. “Non-Coding RNAs in Cardiac Regeneration.” *Oncotarget* 6 (40): 42613–22. doi:10.18632/oncotarget.6073.

Tapmeier, Thomas T., Amy Fearn, Kathryn Brown, Paramit Chowdhury, Steven H. Sacks, Neil S. Sheerin, and Wilson Wong. 2010. “Pivotal Role of CD4+ T Cells in Renal Fibrosis Following Ureteric Obstruction.” *Kidney International* 78 (4): 351–62.

Thum, Thomas, Nelson Chau, Balkrishen Bhat, Shashi Kumar Gupta, Peter S. Linsley, Johann Bauersachs, and Stefan Engelhardt. 2011. “Comparison of Different miR-21 Inhibitor Chemistries in a Cardiac Disease Model.” *Journal of Clinical Investigation* 121 (2): 461–62. doi:10.1172/JCI45938.

Thum, Thomas, Carina Gross, Jan Fiedler, Thomas Fischer, Stephan Kissler, Markus Bussen, Paolo Galuppo, et al. 2008. “MicroRNA-21 Contributes to Myocardial Disease by Stimulating MAP Kinase Signalling in Fibroblasts.” *Nature* 456 (7224): 980–84. doi:10.1038/nature07511.

Townsend, Danyelle M., Kenneth D. Tew, Lin He, Jarrod B. King, and Marie H. Hanigan. 2009. “Role of Glutathione S-Transferase Pi in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63 (2): 79–85. doi:10.1016/j.biopha.2008.08.004.

Trindade, Anil J., Douglas A. Medvetz, Nicole A. Neuman, Faina Myachina, Jane Yu, Carmen Priolo, and Elizabeth P. Henske. 2013. “MicroRNA-21 Is Induced by Rapamycin in a Model of Tuberous Sclerosis (TSC) and Lymphangioleiomyomatosis (LAM).” Edited by Alfons Navarro. *PLoS ONE* 8 (3): e60014. doi:10.1371/journal.pone.0060014.

Tsai, M.-C., O. Manor, Y. Wan, N. Mosammaparast, J. K. Wang, F. Lan, Y. Shi, E. Segal, and H. Y. Chang. 2010. “Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes.” *Science* 329 (5992): 689–93. doi:10.1126/science.1192002.

Tsuruya, Kazuhiko, Toshiharu Ninomiya, Masanori Tokumoto, Makoto Hirakawa, Kohsuke Masutani, Masatomo Taniguchi, Kyoichi Fukuda, et al. 2003. “Direct

Involvement of the Receptor-Mediated Apoptotic Pathways in Cisplatin-Induced Renal Tubular Cell Death." *Kidney International* 63 (1): 72–82.

Valadi, Hadi, Karin Ekström, Apostolos Bossios, Margareta Sjöstrand, James J Lee, and Jan O Lötvall. 2007. "Exosome-Mediated Transfer of mRNAs and microRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells." *Nature Cell Biology* 9 (6): 654–59. doi:10.1038/ncb1596.

Vickers, Kasey C., Brian T. Palmisano, Bassem M. Shoucri, Robert D. Shamburek, and Alan T. Remaley. 2011. "MicroRNAs Are Transported in Plasma and Delivered to Recipient Cells by High-Density Lipoproteins." *Nature Cell Biology* 13 (4): 423–33. doi:10.1038/ncb2210.

Vinciguerra, Manlio, Antonino Sgroi, Christelle Veyrat-Durebex, Laura Rubbia-Brandt, Leo H. Buhler, and Michelangelo Foti. 2009. "Unsaturated Fatty Acids Inhibit the Expression of Tumor Suppressor Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) via microRNA-21 up-Regulation in Hepatocytes." *Hepatology* 49 (4): 1176–84. doi:10.1002/hep.22737.

Volný, Ondřej, Linda Kašičková, Dominika Coufalová, Petra Cimflová, and Jan Novák. 2015. "microRNAs in Cerebrovascular Disease." In *microRNA: Medical Evidence*, edited by Gaetano Santulli, 888:155–95. Cham: Springer International Publishing. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22671-2_9.

Wang, Gang, Bonnie CH Kwan, Fernand MM Lai, Paul CL Choi, Kai-Ming Chow, Philip KT Li, and Cheuk-Chun Szeto. 2010. "Intrarenal Expression of microRNAs in Patients with IgA Nephropathy." *Laboratory Investigation* 90 (1): 98–103.

Wang, Gang, Bonnie Ching-Ha Kwan, Fernand Mac-Moune Lai, Kai-Ming Chow, Philip Kam-Tao Li, and Cheuk-Chun Szeto. 2010. "Expression of microRNAs in the Urinary Sediment of Patients with IgA Nephropathy." *Disease Markers* 28 (2): 79–86.

Wang, Gang, Bonnie Ching-Ha Kwan, Fernand Mac-Moune Lai, Kai-Ming Chow, Philip Kam-Tao Li, and Cheuk-Chun Szeto. 2011. "Elevated Levels of miR-146a and miR-155 in Kidney Biopsy and Urine from Patients with IgA Nephropathy." *Disease Markers* 30 (4): 171–79.

Wang, Kwan, Lai, Chow, Li, Szeto. 2013. "Urinary Sediment miRNA Levels in Adult Nephrotic Syndrome." *Clinica Chimica Acta* 418 (March): 5–11. doi:10.1016/j.cca.2012.12.011.

Wang, Gang, Jun Jie Wang, Hong Ming Tang, and Shing Shun Tony To. 2015. "Targeting Strategies on miRNA-21 and PDCD4 for Glioblastoma." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 580 (August): 64–74. doi:10.1016/j.abb.2015.07.001.

Wang, J., L. Duan, L. Tian, J. Liu, S. Wang, Y. Gao, and J. Yang. 2015. "Serum miR-21 May Be a Potential Diagnostic Biomarker for Diabetic Nephropathy." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 124 (07): 417–23. doi:10.1055/s-0035-1565095.

Wang, Jin-Yang, Yan-Bin Gao, Na Zhang, Da-Wei Zou, Peng Wang, Zhi-Yao Zhu, Jiao-Yang Li, et al. 2014. "miR-21 Overexpression Enhances TGF-β1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Target smad7 and Aggravates Renal Damage in Diabetic Nephropathy." *Molecular and Cellular Endocrinology* 392 (1-2): 163–72. doi:10.1016/j.mce.2014.05.018.

Wang, Jinyang, Yanbin Gao, Mingfei Ma, Minzhou Li, Dawei Zou, Jinkui Yang, Zhiyao Zhu, and Xuan Zhao. 2013. "Effect of miR-21 on Renal Fibrosis by Regulating MMP-9 and TIMP1 in Kk-Ay Diabetic Nephropathy Mice." *Cell Biochemistry and Biophysics* 67 (2): 537–46. doi:10.1007/s12013-013-9539-2.

Wang, Kai, Shile Zhang, Jessica Weber, David Baxter, and David J. Galas. 2010. "Export of microRNAs and microRNA-Protective Protein by Mammalian Cells." *Nucleic Acids Research* 38 (20): 7248–59. doi:10.1093/nar/gkq601.

Wang, Na, Chao-qi Zhang, Jia-huan He, Xiao-fei Duan, Yuan-yuan Wang, Xiang Ji, Wen-qiao Zang, et al. 2013. "miR-21 Down-Regulation Suppresses Cell Growth, Invasion and Induces Cell Apoptosis by Targeting FASL, TIMP3, and RECK Genes in Esophageal Carcinoma." *Digestive Diseases and Sciences* 58 (7): 1863–70. doi:10.1007/s10620-013-2612-2.

Wen, Jessica, and Joshua R. Friedman. 2012. "miR-122 Regulates Hepatic Lipid Metabolism and Tumor Suppression." *Journal of Clinical Investigation* 122 (8): 2773–76. doi:10.1172/JCI63966.

Wickramasinghe, N. S., T. T. Manavalan, S. M. Dougherty, K. A. Riggs, Y. Li, and C. M. Klinge. 2009. "Estradiol Downregulates miR-21 Expression and Increases miR-21 Target Gene Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells." *Nucleic Acids Research* 37 (8): 2584–95. doi:10.1093/nar/gkp117.

Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun. 1993. "Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin-4 Mediates Temporal Pattern Formation in C. Elegans." *Cell* 75 (5): 855–62.

Wilflingseder, Julia, Judith Sunzenauer, Eva Toronyi, Andreas Heinzel, Alexander Kainz, Bernd Mayer, Paul Perco, Gábor Telkes, Robert M. Langer, and Rainer Oberbauer. 2014. "Molecular Pathogenesis of Post-Transplant Acute Kidney Injury: Assessment of Whole-Genome mRNA and MiRNA Profiles." Edited by Giovanni Camussi. *PLoS ONE* 9 (8): e104164. doi:10.1371/journal.pone.0104164.

Wu, Hao, Lili Kong, Yi Tan, Paul N. Epstein, Jun Zeng, Junlian Gu, Guang Liang, et al. 2016. "C66 Ameliorates Diabetic Nephropathy in Mice by Both Upregulating NRF2 Function via Increase in miR-200a and Inhibiting miR-21." *Diabetologia* 59 (7): 1558–68. doi:10.1007/s00125-016-3958-8.

Wu, Zhongwen, Haifeng Lu, Jifang Sheng, and Lanjuan Li. 2012. "Inductive microRNA-21 Impairs Anti-Mycobacterial Responses by Targeting IL-12 and Bcl-2." *FEBS Letters* 586 (16): 2459–67. doi:10.1016/j.febslet.2012.06.004.

Wynn, Ta. 2008. "Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis." *The Journal of Pathology* 214 (2): 199–210. doi:10.1002/path.2277.

Xie, Jingyuan, Krzysztof Kiryluk, Weiming Wang, Zhaohui Wang, Shanmai Guo, Pingyan Shen, Hong Ren, et al. 2012. "Predicting Progression of IgA Nephropathy: New Clinical Progression Risk Score." Edited by Ivan Cruz Moura. *PLoS ONE* 7 (6): e38904. doi:10.1371/journal.pone.0038904.

Xu, Guangxian, Yilin Zhang, Jun Wei, Wei Jia, Zhaohui Ge, Zhaobo Zhang, and Xiaoming Liu. 2013. "MicroRNA-21 Promotes Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Proliferation through Repression of Mitogen-Activated Protein Kinase-Kinase 3." *BMC Cancer* 13 (1): 469.

Xu, X., A. J. Kriegel, X. Jiao, H. Liu, X. Bai, J. Olson, M. Liang, and X. Ding. 2014. "miR-21 in Ischemia/reperfusion Injury: A Double-Edged Sword?" *Physiological Genomics* 46 (21): 789–97. doi:10.1152/physiolgenomics.00020.2014.

Xu, Xialian, Alison J. Kriegel, Yong Liu, Kristie Usa, Domagoj Mladinov, Hong Liu, Yi Fang, Xiaoqiang Ding, and Mingyu Liang. 2012. "Delayed Ischemic Preconditioning Contributes to Renal Protection by Upregulation of miR-21." *Kidney International* 82 (11): 1167–75. doi:10.1038/ki.2012.241.

Xu, Xialian, Nana Song, Xue Zhang, Xiaoyan Jiao, Jiachang Hu, Mingyu Liang, Jie Teng, and Xiaoqiang Ding. 2016. "Renal Protection Mediated by Hypoxia Inducible Factor-1α Depends on pro-Angiogenesis Function of miR-21 by Targeting Thrombospondin 1:" *Transplantation*, September, 1. doi:10.1097/TP.0000000000001501.

Yan, M., C. Chen, W. Gong, Z. Yin, L. Zhou, S. Chaugai, and D. W. Wang. 2015. "miR-21-3p Regulates Cardiac Hypertrophic Response by Targeting Histone Deacetylase-8." *Cardiovascular Research* 105 (3): 340–52. doi:10.1093/cvr/cvu254.

Yang, H.-S., A. P. Jansen, A. A. Komar, X. Zheng, W. C. Merrick, S. Costes, S. J. Lockett, N. Sonenberg, and N. H. Colburn. 2003. "The Transformation Suppressor Pdcd4 Is a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A Binding Protein That Inhibits Translation." *Molecular and Cellular Biology* 23 (1): 26–37. doi:10.1128/MCB.23.1.26-37.2003.

Yang, Jingyue, Bo Qiu, Xiao Li, Hongmei Zhang, and Wenchao Liu. 2015. "p53-p66shc/miR-21-Sod2 Signaling Is Critical for the Inhibitory Effect of Betulinic Acid on Hepatocellular Carcinoma." *Toxicology Letters* 238 (3): 1–10. doi:10.1016/j.toxlet.2015.07.016.

Yang, Jr-Shiuan, and Eric C. Lai. 2011. "Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants." *Molecular Cell* 43 (6): 892–903. doi:10.1016/j.molcel.2011.07.024.

Yang, Zhenhua, Surong Fang, Yicheng Di, Weiwei Ying, Yan Tan, and Wei Gu. 2015. "Modulation of NF-κB/miR-21/PTEN Pathway Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer to Cisplatin." *PloS One* 10 (3): e0121547.

Young, Matthew R., Hsin-Sheng Yang, and Nancy H. Colburn. 2003. "Promising Molecular Targets for Cancer Prevention: AP-1, NF-κB and Pdcd4." *Trends in Molecular Medicine* 9 (1): 36–41.

Yuan, Alex, Erica L. Farber, Ana Lia Rapoport, Desiree Tejada, Roman Deniskin, Novrouz B. Akhmedov, and Debora B. Farber. 2009. "Transfer of MicroRNAs by Embryonic Stem Cell Microvesicles." Edited by Alfred Lewin. *PLoS ONE* 4 (3): e4722. doi:10.1371/journal.pone.0004722.

Zarjou, A., S. Yang, E. Abraham, A. Agarwal, and G. Liu. 2011. "Identification of a microRNA Signature in Renal Fibrosis: Role of miR-21." *AJP: Renal Physiology* 301 (4): F793–F801. doi:10.1152/ajprenal.00273.2011.

Zaug, Arthur J., and Thomas R. Cech. 1980. "In Vitro Splicing of the Ribosomal RNA Precursor in Nuclei of Tetrahymena." *Cell* 19 (2): 331–38. doi:10.1016/0092-8674(80)90507-3.

Zeisberg, M., and E. G. Neilson. 2010. “Mechanisms of Tubulointerstitial Fibrosis.” *Journal of the American Society of Nephrology* 21 (11): 1819–34. doi:10.1681/ASN.2010080793.

Zhang, Aimin, Yi Liu, Yizhen Shen, Youhe Xu, and Xiangtie Li. 2011. “miR-21 Modulates Cell Apoptosis by Targeting Multiple Genes in Renal Cell Carcinoma.” *Urology* 78 (2): 474.e13–474.e19. doi:10.1016/j.urology.2011.03.030.

Zhang, Kai-liang, Lei Han, Lu-yue Chen, Zhen-dong Shi, Ming Yang, Yu Ren, Ling-chao Chen, Jun-xia Zhang, Pei-yu Pu, and Chun-sheng Kang. 2014. “Blockage of a miR-21/EGFR Regulatory Feedback Loop Augments Anti-EGFR Therapy in Glioblastomas.” *Cancer Letters* 342 (1): 139–49. doi:10.1016/j.canlet.2013.08.043.

Zhang, Wanzhe, and Liliang Shu. 2016. “Upregulation of miR-21 by Ghrelin Ameliorates Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting Inflammation and Cell Apoptosis.” *DNA and Cell Biology* 35 (8): 417–25. doi:10.1089/dna.2016.3231.

Zhang, Xiaomin, Gohar Azhar, Scott A. Helms, and Jeanne Y. Wei. 2011. “Regulation of Cardiac microRNAs by Serum Response Factor.” *Journal of Biomedical Science* 18 (1): 1.

Zhang, Yanhua, Songyan Wang, Shengmao Liu, Chunguang Li, and Ji Wang. 2015. “Role of Smad Signaling in Kidney Disease.” *International Urology and Nephrology* 47 (12): 1965–75. doi:10.1007/s11255-015-1115-9.

Zhang, Yujing, Danqing Liu, Xi Chen, Jing Li, Limin Li, Zhen Bian, Fei Sun, et al. 2010. “Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration.” *Molecular Cell* 39 (1): 133–44. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.010.

Zhang, Zheng, Huimin Peng, Junxia Chen, Xin Chen, Fei Han, Xiaoming Xu, Xiaoyan He, and Ning Yan. 2009. “MicroRNA-21 Protects from Mesangial Cell Proliferation Induced by Diabetic Nephropathy in Db/db Mice.” *FEBS Letters* 583 (12): 2009–14. doi:10.1016/j.febslet.2009.05.021.

Zhang, Zhiyu, Zejuan Li, Caiping Gao, Ping Chen, Jianjun Chen, Wenzhong Liu, Shudong Xiao, and Hong Lu. 2008. “miR-21 Plays a Pivotal Role in Gastric Cancer Pathogenesis and Progression.” *Laboratory Investigation* 88 (12): 1358–66.

Zhang, Ziqiang, Z. Zhu, K. Watabe, X. Zhang, C. Bai, M. Xu, F. Wu, and Y. Y. Mo. 2013. “Negative Regulation of lncRNA GAS5 by miR-21.” *Cell Death & Differentiation* 20 (11): 1558–68.

Zhong, X., A. C. K. Chung, H. Y. Chen, Y. Dong, X. M. Meng, R. Li, W. Yang, F. F. Hou, and H. Y. Lan. 2013. “miR-21 Is a Key Therapeutic Target for Renal Injury in a Mouse Model of Type 2 Diabetes.” *Diabetologia* 56 (3): 663–74. doi:10.1007/s00125-012-2804-x.

Zhong, X., A. C. K. Chung, H.-Y. Chen, X.-M. Meng, and H. Y. Lan. 2011. “Smad3-Mediated Upregulation of miR-21 Promotes Renal Fibrosis.” *Journal of the American Society of Nephrology* 22 (9): 1668–81. doi:10.1681/ASN.2010111168.

Zhou, J., K.-C. Wang, W. Wu, S. Subramaniam, J. Y.- J. Shyy, J.-J. Chiu, J. Y.- S. Li, and S. Chien. 2011. “MicroRNA-21 Targets Peroxisome Proliferators-Activated Receptor- in an Autoregulatory Loop to Modulate Flow-Induced Endothelial Inflammation.”

Proceedings of the National Academy of Sciences 108 (25): 10355–60. doi:10.1073/pnas.1107052108.

Zhou, Liang, Zhao-Xu Yang, Wen-Jie Song, Qing-Jun Li, Fan Yang, De-Sheng Wang, Ning Zhang, and Ke-Feng Dou. 2013. "MicroRNA-21 Regulates the Migration and Invasion of a Stem-like Population in Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Oncology* 43 (2): 661–69. doi:10.3892/ijo.2013.1965.

Zhu, Hua-Yu, Chao Li, Wen-Dong Bai, Lin-Lin Su, Jia-Qi Liu, Yan Li, Ji-Hong Shi, et al. 2014. "MicroRNA-21 Regulates hTERT via PTEN in Hypertrophic Scar Fibroblasts." Edited by Partha Mukhopadhyay. *PLoS ONE* 9 (5): e97114. doi:10.1371/journal.pone.0097114.

Zununi Vahed, Sepideh, Yadollah Omidi, Mohammadreza Ardalan, and Nasser Samadi. 2016. "Dysregulation of Urinary miR-21 and miR-200b Associated with Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy (IFTA) in Renal Transplant Recipients." *Clinical Biochemistry*, August. doi:10.1016/j.clinbiochem.2016.08.007.

ANNEXES

Annexe 1

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

INTÉRÊT DE LA CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE D'OXFORD DANS L'ÉVALUATION DU PRONOSTIC DE LA MALADIE DE BERGER.

Z. Jomaa[1], M.-F. Hennino[1], M. Hazzan[1], C. Noël[1], D. Buob[2], F. Glowacki[1]
[1] Service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation, CHRU Lille
[2] Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHRU Lille

INTRODUCTION

Du fait de la variabilité des formes cliniques de la néphropathie à IgA (NIgA), trouver des marqueurs prédictifs de l'évolution rénale à l'échelle individuelle, reste un enjeu clinique déterminant. Dans cette étude rétrospective, nous évaluons, au moment du diagnostic, différents facteurs cliniques et histologiques (en se basant sur la classification d'Oxford) et les confrontons au devenir fonctionnel rénal.

MÉTHODES

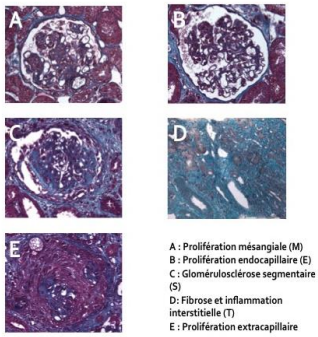
Soixante deux patients avec une NIgA diagnostiquée entre 2002 et 2012, ont été inclus. La durée moyenne de suivi était de 43 mois. L'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) est survenue dans 27% des cas. En utilisant, comme critère de jugement la survie rénale, différents facteurs pronostiques cliniques (Insuffisance rénale (IR), Hypertension artérielle (HTA), Protéinurie et histologiques (score de MEST de la classification d'Oxford) sont évalués.

RÉSULTATS

A l'inclusion, 84% des patients présentent une hypercellularité mésangiale (M1), 14% une hypercellularité endocapillaire (E1), 61% une glomérulosclérose segmentaire (S1) et 46% une fibrose interstitielle/atrophie tubulaire (T≥1).
Cliniquement, 87% des patients ont une protéinurie > 0,3 g/j, et 49% un débit de filtration glomérulaire estimé < 60 mL/min/1,73m².

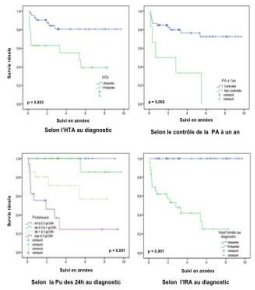
En analyse univariée, l'HTA (p = 0,03), la présence d'une insuffisance rénale, la protéinurie des 24 heures au moment du diagnostic (p < 0,001) sont significativement corrélées à une différence de survie rénale. Sur le plan histo-pronostique, la fibrose interstitielle est le facteur le plus discriminant (p < 0 ,001), suivie de la glomérulosclérose segmentaire (p = 0 ,003) et de la prolifération mésangiale (p = 0,023).
On ne retrouve pas d'impact de la prolifération endocapillaire. La présence d'une prolifération extracapillaire (non prise en compte dans le score de MEST) est associée à un surcroit de mortalité précoce (p = 0,026).

Principales lésions histologiques retrouvées au moment du diagnostic :

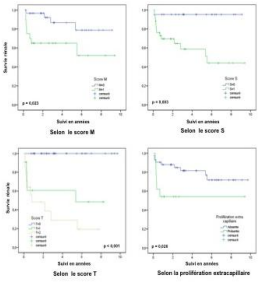


A : Prolifération mésangiale (M)
B : Prolifération endocapillaire (E)
C : Glomérulosclérose segmentaire (S)
D: Fibrose et inflammation interstitielle (T)
E : Prolifération extracapillaire

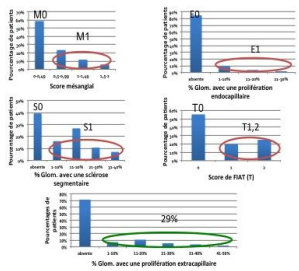
Courbes de survie rénale selon la pression artérielle (PA), la protéinurie (Pu) et l'insuffisance rénale aiguë (IRA) :



Courbes de survie rénale selon les lésions histologiques : prolifération Mésangiale (M), Sclérose segmentaire (S), fibrose interstitielle (T) et la prolifération extracapillaire.



Fréquence des principales lésions histologiques dans la population :



CONCLUSION

En analyse univariée, tous les éléments du MEST, à l'exception de la prolifération endocapillaire , sont des facteurs pronostiques de la survie rénale. Cependant, des paramètres cliniques (IRA au diagnostic, Protéinurie) ou histologiques simples (sévérité de la fibrose interstitielle) permettent une estimation du pronostic rénal sans établir un score histologique spécifique.

Increased expression of miR-21 in IgA nephropathy fibrotic lesions

Marie Flore Hennino[1,2,4], Cynthia Van der Hauwaert[2], David Buob[3], Grégoire Savary[2], Dominique Pagniez[1], Christian Noel[1], Christelle Cauffiez[2], Francois Glowacki [1,3].

[1] :Nephrology Dpt, Lille University Hospital, France.
[2] : EA4483 research Dpt. Lille University, France.
[3] :Pathology Dpt, Lille University Hospital, France.
[4] :Nephrology Dpt, Valenciennes Hospital, France.

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

FACULTE DE MEDECINE

ABSTRACT

Background: Progressive IgA nephropathy (IgAN) leads to glomerular and interstitial fibrosis. Fibrosis grade is a key determinant of disease prognosis. MicroRNAs (miR), are small non coding RNA, acting as post-transcriptional gene regulators. miRNAs are implicated in various fi bro-proliferative disorders. Recently, miR-21 has been suggested to be involved in the renal fi brosis process.The aim of this study was to assess the implication of miR-21 in kidney fibrosis occurring in IgAN.

Methods: A cohort of 56 patients with IgAN (biopsy proved) was selected. For each patient, the renal biopsy was scored according to Oxford classification, including mesangial proliferation (M score), endocapillary hypercellularity (E score), segmental glomerulosclerosis (S score) and interstitial fi brosis (T score). After extraction of total RNAs, the level of miR-21 was measured in renal biopsies by Q-PCR. Furthermore miR-21 expression was studied by *in situ* hybrydization (ISH).

Results: Renal expression of miR-21 was signifi cantly higher in renal tissue of patients with IgAN and severe lesions of interstitial fi brosis (miR-21 relative quatifi cation: for T0 score: 1.64±1.67; for T1 score: 5.38±3.8; for T2 score: 8.88±9.37; p=0.001 for T0 versus T2, or for T0 versus T1). miR-21 expression was independent of the M and E scores and was also associated with renal survival (OR for renal replacement therapy in patient with miR-21 tissue expression above the median value: 7,3, IC 95% [1,72;31,18]). Finally ISH analysis revealed that miR-21 is highly expressed in the fi brotic interstitial area.

Conclusions: Our data suggest that miR-21 is involved in renal fibrosis occurring during IgA nephropathy. In this context, miR-21 may be an interesting non invasive biomarker of fibrosis and/or an innovative therapeutic target in IgAN.

Background

miR	Modif.	Effect	Impact on TGF ß pathway	Targets	Ref
miR-29	Down	Anti fibrotic	Yes	Collagens	Chang 2013, Wang 2012, Qun 2011, Fang 2013
	Up	Pro Fibrotic		Sprouty-1	Long 2011
miR-21	Up	Pro Fibrotic	Yes	Smad7, PPARα, Sprouty-1	Chang 2013, Zeyu 2011, Zhong 2013
miR-192	Down	Anti Fibrotic	Yes	ZEB2	Wang 2010, Krupa 2010
	Up	Pro Fibrotic	Yes	ZEB2	Kato 2007, Chung 2010, Deshpande 2013
miR-150	Up	Pro Fibrotic	Yes	SOCS1	Zhou 2013
miR-let7	Down	Anti Fibrotic	Yes	Collagens TGFß1-R	Wang 2013, Brennan 2013
miR-324	Up	Pro Fibrotic	No	Prolyl endopeptidase	Mercorio 2012
miR-200	Down	Anti Fibrotic	Yes	ZEB1 TGFß2	Oba 2010, Wang 2011

- Recent studies describe microRNA dysregulation during kidney fibrogenesis.
- Among them, mir 21 appears particulary involved in the renal fibrosis process.
- Of note : miR-21 targets smad 7, PPAR alpha, and Sprouty-1.
- Several recent clinical studies demonstrate the impact of interstitial fibrosis (IF) on renal survival in IgAnephropathy. (Oxford study in a group of 65 patients : Cattran et al., 2009; VALIGA study (1147 patients), Coppo et al, 2014)

- Also we aim to analyse the implication of miR-21 in the progression of interstitial fibrosis during IgA nephropathy

Conclusion

- **Renal fibrosis** is a **prognosis** factor in IgA Nephropathy

- **miR-21** :
  - is overexpressed in patient with **fibrosis** during IgA nephropathy
  - is linked to renal **prognosis**
  - is **implicated *in vitro*** in fibrosis process

⇒ **non-invasive biomarker** (circulating miR-21)
⇒ innovative **therapeutic target** (antagomiR)

Material and methods

Retrospective study including 62 patients with an histological diagnosis of IgA nephropathy.

Population Charateristics (n=62)	
Clinical data	
Age (years)	36,1 ± 13,9 (15-66)
Sex ratio (m:f)	2,3:1
BMI (kg/m²)	25,6 ± 5,86 (17,1)
HBP	30,60%
- SBP (mmHg)	134 ± 21 (95-190)
- DBP (mmHg)	79,4 ± 15,7 (50-130)
RAS blockade	24,20%
Biological data	
Creatinine (mg/L)	21,6 ± 19,5 (7-103)
eGFR (mL/min/1,73m²)	61 ± 37 (4,5-140)
RF at diagnosis	36,70%
Proteinuria (g/24h)	2,3 ± 3,4 (0,01-8)
Nephrotic syndrom	11,30%
Hematuria	91,70%

Biopsies were graded according the Oxford Classification.

OXFORD CLASSIFICATION			
Mesangial hypercellularity	Endocapillary hypercellularity	Segmental glomerulosclerosis	Interstitial fibrosis
M0 60,8 %	E0 85,2 %	S0 38,2 %	T0 57,2 %
M1 39,2 %	E1 14,8 %	S1 61,8 %	T1 21,4 %
			T2 21,4 %

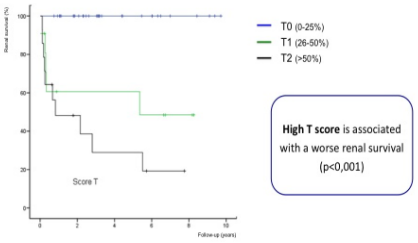
Results

Survival analysis :

- Mean follow-up : 42,9 months

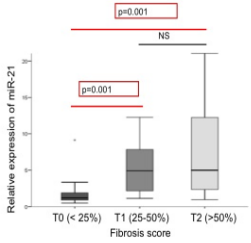
- End point of survival analysis : ESRD (dialysis / transplantation) : 27% of the patients.

Figure 1 : Renal survival according the T score of interstitial fibrosis



High T score is associated with a worse renal survival (p<0,001)

Figure 2 : Renal relative expression of miR-21 in accordance with fibrosis grade. (ARN extraction from paraffine embedded biopsy ; qPCR)

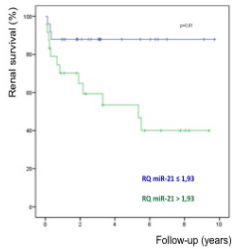


miR-21 :

- overexpressed when IF is moderate or severe

- no association with M or E score (data not shown) : **specific of fibrosis**

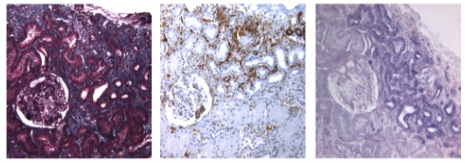
Figure 3 : Renal survival in terms of miR-21 renal relative expression (low vs high).



miR-21 expression is associated **with renal prognosis**

OR (for devellopping ESRD) = 7.3 ; 95% CI [1.72, 31.18] p = 0.007

Figure 4 : Localisation of miR-21 in renal tissue.



Masson's trichrome | α-SMA | miR-21

α-SMA is expressed by myofibroblasts, marking fibrosis aera

miR-21 is colocalised aeras of fibrosis

ABSTRACT number : 1584 Poster Number : Fr-PO526

Annexe 2

Annexe 3

L'expression rénale de miR-21-5p et associée à la fibrose et à la survie rénale au cours de la néphropathie à IgA

miR-21-5p renal expression is associated with fibrosis and renal survival in patients with IgA nephropathy

Marie-Flore Hennino[1,2], David Buob[3], Cynthia Van der Hauwaert[1], Viviane Gnemmi[4],Zacharie Jomaa[5], Nicolas Pottier[1], Grégoire Savary[1], Elodie Drumez[6], Christian Noël[7], Christelle Cauffiez[1] & François Glowacki[1].

[1]Univ. Lille, CHU Lille - Service de néphrologie, Institut Pasteur de Lille, EA 4483 - IMPECS - IMPact of Environmental ChemicalS on human health, F-59000 Lille, France. [2]Centre Hospitalier de Valenciennes - Service de néphrologie, médecine interne et vasculaire, F-59300 Valenciennes, France.

[3]Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, Inserm, AP-HP, Hôpital Tenon, Pathology Department, UMR S 1155, F-75020 Paris, France.

[4]Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172 - JPArc - Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France.

[5]Centre Hospitalier de Cambrai - Service de néphrologie, F-59400 Cambrai, France.

[6]Univ. Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique: épidémiologie et qualité des soins, F-59000 Lille, France.

[7]Univ. Lille, Inserm, CHU Lille - Service de néphrologie, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France.

ABSTRACT

IgA nephropathy (IgAN) is the most prevalent primary glomerulonephritis, whose prognosis is highly variable. Interstitial fibrosis is a strong independent prognosis factor. Among microRNA involved in renal fibrogenesis, only few have been investigated in IgAN. In the context of IgAN, we aimed to analyse the role of miR-21-5p, miR-214-3p and miR-199a-5p, three established "fibromiRs" involved in renal fibrosis. Fifty-six IgAN biopsy specimens were retrospectively scored according to Oxford classification. Renal expression of miR-21-5p, miR-214-3p and miR-199a-5p were

significantly associated with T score (miR-21-5p T0 RQ median = 1.23, T1 RQ = 3.01, T2 RQ = 3.90; miR-214-5p T0RQ = 1.39, T1 RQ = 2.20, T2 RQ = 2.48; miR-199a-5p T0 RQ = 0.76, T1 RQ = 1.41, T2 RQ = 1.87). miR-21-5p expression was associated with S score (S0 RQ median = 1.31, S1 RQ = 2.65), but not miR-214-3pnor miR-199a-5p. In our cohort, poor renal survival was associated with high blood pressure, proteinuria and elevated creatininemia, as well as T and S scores. Moreover, renal expression of miR-21-5p, miR-214-3p were associated with renal survival. In conclusion, miR-21-5p, miR-214-3p and miR-199a-5p are three "fibromiRs" involved in renal fibrosis in the course of IgAN and miR-21-5p and miR-214-3p are associated with renal survival.

Introduction

IgA nephropathy (IgAN) is the most prevalent primary glomerulonephritis leading to end stage renal disease (ESRD) in 20% to 40% of patients[1,2]. IgAN is an immune complex-mediated proliferative glomerulonephritis characterized by IgA mesangial deposition. New pathogenesis approaches of primary IgAN rely on a multihit model in patients with particular genetic backgrounds[3]. Broadly speaking, increased production of hypogalactosylated IgA1[4] elicits an autoimmune response characterized by the specific synthesis of anti-glycan antibodies[5] followed by the formation and deposition of pathogenic immune IgA – IgG complexes in the glomerular mesangium[6] resulting in inflammation and fibrosis[7,8] characterized by substantial tissue remodeling and destruction of functional renal tissue[9].

The histologic features of IgAN are diverse and include active lesions represented by mesangial hypercellularity, endocapillary and/or extra-capillary proliferation, as well as scarring lesions characterized by glomerular sclerosis and interstitial fibrosis[10]. The Oxford IgAN classification is a pathologic scoring system based on the pattern and the severity of both proliferative (mesangial and endocapillary hypercellularity) and scarring (segmental glomerular sclerosis and interstitial fibrosis) changes, and represents an established prognostic factor of IgAN[11,12]. In line with original and replicative studies, interstitial fibrosis is a relevant histological prognosis factor[11,12].

MicroRNAs (miRNA) consist of about 22 nucleotides that imperfectly hybridize to 3'-UTR or other regions of messenger RNAs, typically leading to translation inhibition or transcript degradation. The large number of miRNAs, currently exceeding 2,000 in human (http://www.mirbase.org/), and their poor binding specificities lead to a huge number of potential miRNA-target gene interactions, which is thought to regulate up to 60% of human mRNAs[13]. Although miRNAs are involved in virtually all physio-pathological processes[14], their role in IgAN pathogenesis is still in its infancy[15]. Here, based on our previous and ongoing studies[16–18], we focused on three well-established "fibromiRs": miR-21-5p, miR-199a-5p and miR-214-3p[19]. Several experimental models have indeed unravelled the implication of these miRNAs in various experimental models of tissue fibrosis[16,20,21] as well as fibroproliferative diseases[19]. In particular, these miRNAs are consistently upregulated during fibrosis and represent prominent regulatory factors of TGFβ signaling, a major biological pathway driving fibrosis[17,22,23].

In this study, we evaluated for the first time the renal expression of three established "fibromiRs" (miR-21-5p,miR-199a-5p and miR-214-3p) in IgAN, as well as their association with Oxford classification, and renal survival.

Results

Patient characteristics. This study included 61 patients whose clinical and biological characteristics are shown in Table 1. Mean age was 36.3 ± 13.6 years. At diagnosis, 19 (31.1%) of the patients exhibited hypertension,56 (91.8%) had hematuria, and 54 (88.5%) displayed significant proteinuria (≥ 0.3 g/24h) with five patients (8.2%)having nephrotic syndrome. Thirty-two patients (52.5%) developed a renal failure (estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 60 mL/min/1.73 m2) at diagnosis with a mean serum creatinine of 32.8 ± 21.9 mg/L.

Clinical data (n = 61)			
Age (years)	36.3 ± 13.6		
Sex ratio (men:women)	2.2:1		
Follow-up (months)	48.9 ± 38.1		
BMI (kg/m²)	25.7 ± 5.9		
HBP	19 (30.6%)		
- systolic BP (mmHg)	134 ± 21		
- diastolic BP (mmHg)	79 ± 16		
Prior RAAS blockade	24.2%		
Biological data (n = 61)			
Creatininemia (mg/L)	21.8 ± 19.6		
eGFR (mL/min/1.73 m²)	60 ± 36		
RF at diagnosis	37.7%		
Proteinuria (g/24h)	2.3 ± 2.3		
Nephrotic syndrom	5 (8.2%)		
Hematuria	56 (91.9%)		
Histological data (n = 56)			
M item	M0 n = 31 (55.4%)	M1 20 (35.7%)	NA 5 (8.9%)
E item	E0 46 (82.1%)	E1 8 (14.3%)	NA 2 (3.6%)
S item	S0 21 (37.5%)	S1 34 (60.7%)	NA 1 (1.8%)
T item	T0 32 (57.1%)	T1 12 (21.4%)	T2 12 (21.4%)
Extra-capillary proliferation	Absent n = 40 (71.4%)	Present n = 16 (28.6%)	

Table 1: Clinical, biological and histological characteristics of the population. Values are means ±standard deviation. Abbreviations: BMI: Body Mass Index; HBP: High Blood Pressure, defined as systolic BP >140 mmH, or diastolic BP > 90 mmHg, or previous antihypertensive drug intake; BP: Blood Pressure; RAAS : Renin-Angiotensin-Aldosterone System; eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate by MDRD; RF: RenalFailure, defined as eGFR < 60 mL/min/1.73 m2; NA: Not Available (no analyzable glomerulus).

At diagnosis, blockers of renin-angiotensin-aldosterone system were widely used (51 (83.6%)). Furthermore, six patients (9.8%) received steroids; these six patients displayed severe renal disease (mean serum creatinine 43.2 ± 20.9 mg/L, mean eGFR 20 mL/min/1.73 m2) with high proteinuria (mean 4.9 ± 2.7 g/24 h), and their evolution was pejorative, as they all progressed to ESRD.

Pathological Features. Renal biopsy specimens were analyzed in 56/61 (91.8%) cases. Histological sections contained an average of 16.5 ± 10.1 glomeruli, including 26.1% globally sclerotic glomeruli. Regarding interstitial fibrosis, 32 (57.2%), 12 (21.4%), and 12 (21.4%) biopsy specimens were scored T0 (no or mild fibrosis), T1 (moderate fibrosis), and T2 (severe fibrosis), respectively. Pathological characteristics concerning the M, E, and S items of the Oxford classification are shown in Table 1. Extra-

capillary proliferation was noticed in 16 (28.6%) cases, involving 17.2% ± 12.3% of the glomeruli.

Association of miR-21-5p, miR-199a-5p and miR-214-3p renal expression with MEST score. The renal levels of miR-21-5p, miR-199a-5p and miR-214-3p measured by RT-qPCR were highly correlated: $R = 0.876$, $p < 0.0001$ for miR-21-5p and miR-199a-5p, $R = 0.663$, $p < 0.01$ for miR-21-5p and miR-214-3p and $R = 0.675$, $p < 0.01$ for miR-199a-5p and miR-214-3p (Fig. 1a).

The expression levels of miR-21-5p, miR-199a-5p or miR-214-3p were not associated with the active glomerular lesions (i.e. mesangial hypercellularity (M) and endocapillary proliferation (E)) (Fig. 1b). By contrast, renal miR-21-5p, miR-199a-5p and miR-214-3p expression were significantly increased in patients with interstitial (T) and glomerular (S) fibrotic lesions. MiR-21-5p displayed the widest renal expression range amplitude (Fig. 1b). More precisely, miR-21-5p was found to be overexpressed in renal tissue of patients with moderate (T1: median RQ = 3.01 [1.13–12.26]) or severe (T2: median RQ = 3.90 [1.24–25.67]) fibrosis, compared with patients with mild fibrosis (T0: median RQ = 1.23 [0.48–9.12]). Similarly, miR-214-3p was overexpressed in renal tissue of patients with moderate (T1: median RQ = 2.20 [1.67–3.07]) or severe (T2: median RQ = 2.48 [2.03–5.93]) fibrosis, compared with mild fibrosis (T0: median RQ = 1.39[0.02–3.53]). Finally, compared to patients with mild fibrosis (T0: median RQ = 0.76 [0.33–2.27]), miR-199a-5p renal expression was significantly increased only in patients with severe fibrosis (T2: median RQ = 1.87 [0.61–5.20]) but not in patients with moderate fibrosis (T1: median RQ = 1.41). In addition, patients without glomerular sclerosis (S0), displayed lower miR-21-5p expression than patients with S1 lesions ($p = 0.02$) (S0: median RQ = 1.31 [0.48–2.25] *vs* S1: median RQ = 2.65 [0.50–25.67]), whereas expression levels of miR-199a-5p and miR-214-3p were not associated with glomerular segmental sclerosis (Fig. 1b).

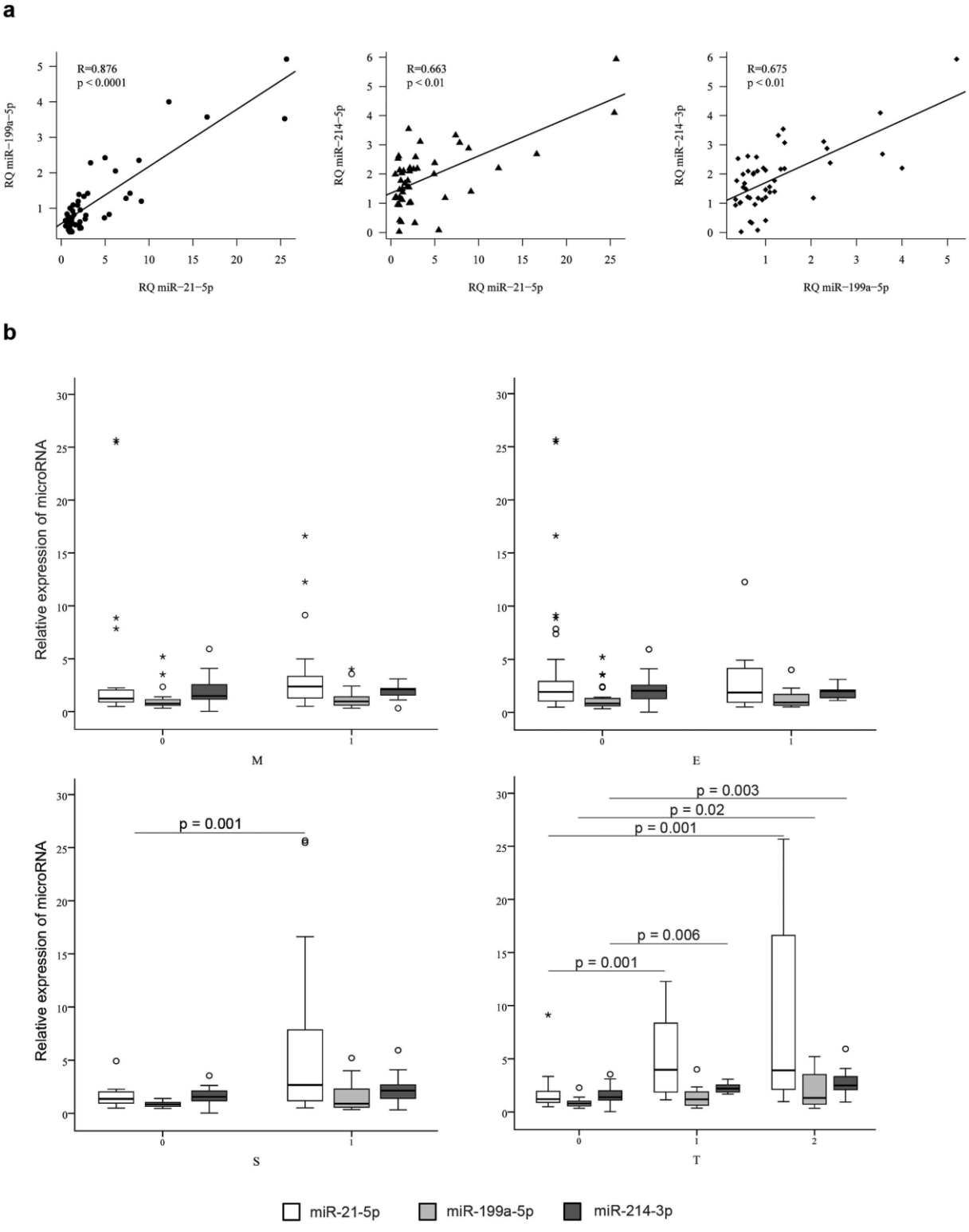


Figure 1: MiR-21-5p, miR-214-3p and miR-199a-5p are associated with segmental glomerulosclerosis (S) and interstitial fibrosis (T). (a) MiR-21-5p, miR-214-3p and miR-199a-5p renal expressions are correlated.(b) MiR-21-5p, miR-214-3p and miR-199-5p renal expression depending on the MEST score.

Then to evaluate whether expression pattern of all three miRNAs could be used to predict disease severity, a principal component analysis (PCA) was performed. Active glomerular lesions were not associated to miRNAs expression pattern: (M0: median RQ = − 0.63 [− 1.66–6.59] vs. M1: median RQ = − 0.24 [− 1.19–3.09], p = 0.15 and E0: median RQ = − 0.42 [− 1.66–6.59] vs. E1: median RQ = − 0.44 [− 1.02–2.65], p = 0.74). Glomerular sclerotic lesions were also not associated to combined miRNAs (S0: median RQ = − 0.59 [− 1.66–0.73] vs. S1: median RQ = − 0.21 [− 1.35–6.59], p = 0.13). However, we confirmed a significant association with miRNAs expression and T score (T0: median RQ = − 0.76 [− 1.66–1.17] vs. T1: median RQ = 0.03 [− 0.83–2.65] (p = 0.007) vs. T2: median RQ = 0.57 [− 1.28–6.59] (p = 0.004)).

Expression pattern of miR-21-5p in renal tissue. As miR-21-5p was strongly associated with fibrosis in IgA patients, tissue localization of miR-21-5p was evaluated by in situ hybridization on biopsy sections.miR-21-5p was primarily expressed in interstitial fibrotic areas, defined by both Masson's trichrome and α –SMA(Smooth Muscle Actin) staining (Fig. 2a), and increased miR-21-5p expression was correlated with the severity of interstitial fibrosis (Fig. 2b). More precisely, miR-21-5p was strongly expressed in epithelial cells of subatrophic tubules, but not in normal epithelial cells. In biopsies with severe interstitial fibrotic lesions (T2), miR-21-5pexpression was more prominent in areas associated with loss of normal tissue architecture.

Determinants of renal survival. During the follow-up (48.9 ± 38.1 months), 17 patients (27.9%) had an ESRD. Increased systolic blood pressure, proteinuria levels, decreased eGFR level, as well as T and S score were associated with renal failure (Table 2, Fig. 3a). Regardless of the renal expression levels of these miRNAs, a non-linear relationship between miRNA expression and the log relative risk of renal failure was found (data not shown). Using the optimal threshold values determined by maximization of hazard ratio, both miR-21-5p and miR-214-3p were significantly associated with risk of renal failure (Fig. 3b). Indeed, patients with miR-21-5pexpression greater than 2.06 had significantly poorer renal survival (HR, 4.08; 95% CI, 1.32–12.55). Similar findings were found for patients with miR-214-3p expression greater than 1.60 (HR, 3.81; 95% CI, 1.06–13.74) (Table 2).

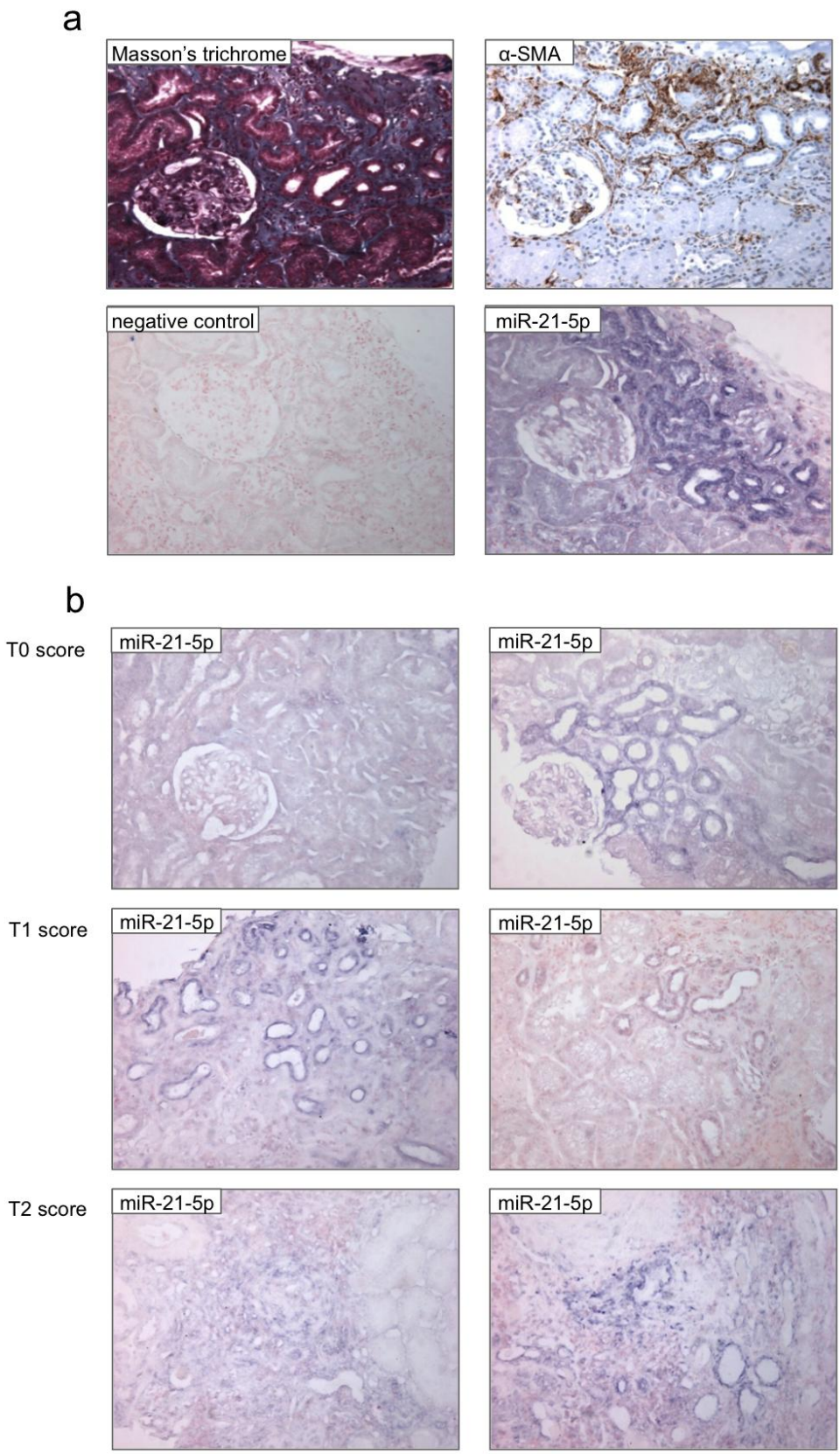


Figure 2: miR-21-5p is expressed in fibrotic areas. (a) miR-21-5p (in situ hybridization) is expressed in subatrophictubules within fibrosis patches, highlighted by Masson's trichrome coloration and α -SMA (α –smoothmuscle actin) immunochemistry (200x). (b) In situ hybridization of miR-21-5p on biopsy according to fibrosis score (200x).

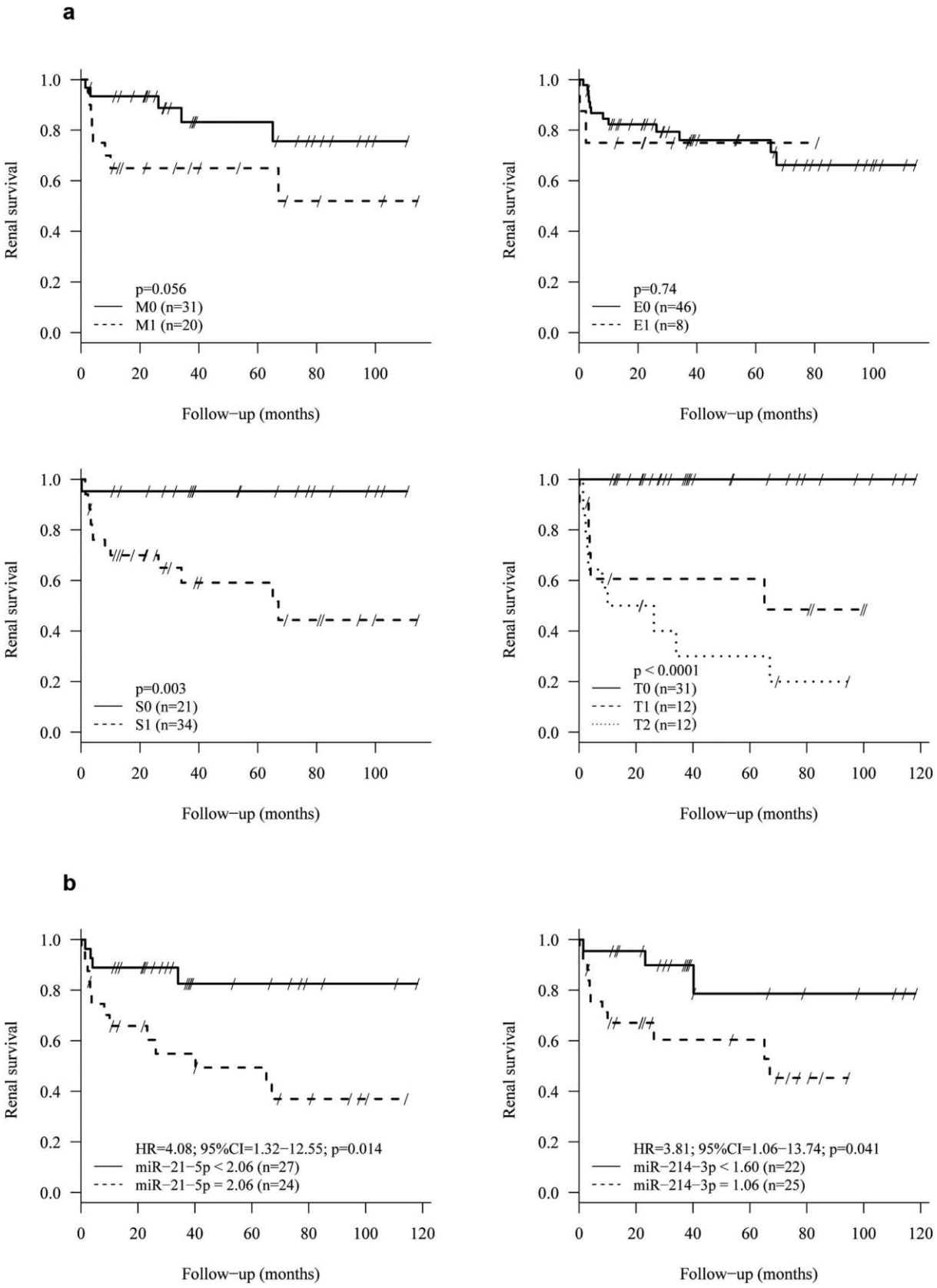


Figure 3: Renal survival is influenced by MEST score and renal expression of miRNAs in univariate analysis. (a) Renal survival is associated with M, S and T scores. (b) Renal expression of miR-21-5p and miR-214-3p are associated with renal survival.

	Hazard Ratio	95% confidence interval	*p*-Value
Clinico-biological data			
Systolic blood pressure*	1.59	1.29–1.97	<0.0001
Proteinuria†	1.57	1.30–1.89	<0.0001
eGFR‡	0.32	0.18–0.55	<0.0001
microRNA			
miR-21-5p ≥2.06	4.08	1.32–12.55	0.014
miR-214-3p ≥1.60	3.81	1.06–13.74	0.041
miR-199a-5p	NA		

Table 2: Univariate association of main clinico-biological characteristics and tissular microRNA withrenal failure-free survival. eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate, NA: Non Applicable. hazard ratioexpressed per * 10 mmHg increase of systolic blood pressure, †1 g/day increase of proteinuria and‡10 mL/min/1.73 m2 increase of eGFR.

Discussion

As IgAN outcome is highly variable and difficult to predict between individuals, the identification of prognostic factors at the time of presentation is of major interest, especially if these markers also represent targets for the development of anti-fibrotic therapeutics[7]. In this context, miRNAs represent attractive candidates as they have gained significant importance as diagnostic/prognostic markers, and constitute potentially innovative therapeutic targets. As developing miRNA antagonists is less challenging than miRNA mimics[19,24], we chose in this study to focus our attention on three well-described pro-fibrotic miRNAs whose expression is consistently increased during fibrogenesis.

Although aberrant miRNA expression exerts a causative pathogenic role in most if not all complex diseases, their implication in IgAN is currently poorly documented[15]. To date, most studies have focused their efforts on the molecular mechanisms leading to the initiation of IgAN. For example, miR-148b and let-7b deregulation may be involved in the aberrant glycosylation of IgA1, which has a central pathogenic role in the early phase of IgAN[25–26]. However, understanding their role in the molecular events underlying kidney disease progression is of major interest since fibrosis has a very strong impact on IgAN outcome. In this context, Wang et al. reported that specific miRNA

are upregulated (miR-141[27] miR-205[27], miR-192[27], miR-146a28 and miR-155[28]) or down regulated (miR-200c[27]) in renal tissue of patients with IgAN compared with non inflammatory glomerulosclerosis. Moreover, renal miR-200c[27], miR-146[28] and miR-155[28] and urinary miR-146a[28], miR-155[28], miR-200a[29],miR-200b[29], miR-429[29], miR-29b[30] and miR-29c[30] are correlated with proteinuria while renal miR-205[27], miR-192[27], miR-146a[28], miR-155[28], and urinary miR-200b[29], miR-429[29], miR-21[30], miR-29b[30] and miR-29c[30] are correlated with kidney function. The same team has also shown that renal expression of miR-205[27] and miR-155[28]are associated with interstitial fibrosis and renal miR-192[27] and urinary miR-93[30] are associated with glomerular sclerosis. Recently, Bao *et al.*[31] showed that miR-21-5p was overexpressed in renal tissue of patients with IgAN compared with normal kidney tissue. Moreover, they positively correlated miR-21-5p glomerular levels with glomerular sclerosis and miR-21-5p tubulo-interstitial levels with interstitial fibrosis[31]. Here, we showed that renal levels of miR-21-5p, miR-199a-5p and miR-214-3p were significantly increased in IgAN patients exhibiting fibrotic changes. Compared to miR-199a-5p and miR-214-3p, miR-21-5p expression displayed greater and earlier variation. Moreover miR-21-5p was specifically associated with tubulo-interstitial fibrosis and glomerular sclerosis but not with active proliferative glomerular lesions. Interestingly, patients with higher expression ofmiR-21-5p (> 2.06) had a significantly worse renal survival. Clinico-biological and histological prognostic factors of IgAN in our cohort were in perfect agreement with the current prognosis factors included in the Oxford scoringsystem[11,12]. Indeed, high blood pressure, heavy proteinuria, and kidney failure are validated risk factors for developing ESRD in the context of IgAN. Similarly, interstitial fibrosis and glomerular sclerosis were two strong prognostic factors of renal survival. Furthermore, no association was found between endocapillary proliferation and renal survival. Taken together these data suggest that our cohort reflects the general population of patients with primary IgAN. Nonetheless, multivariate analysis was not possible given the limited number of patients and the high number of factors affecting renal survival. Therefore, our study should be interpreted as a pilot study and should be confirmed in larger cohorts.

Considering the data already observed about the role of miR-21-5p in other fibrosing kidney diseases such as chronic allograft dysfunction[16] or diabetic nephropathy[32], miR-21-5p is very likely a key player in renal fibrosis, regardless of the

underlying renal disease. Although miR-21-5p dysregulation is not specific of IgAN, these results, particularly those concerning miR-21-5p, open new promising diagnostic and therapeutic options in the field of IgAN. Several studies have suggested the potential value of circulating miRNAs as diagnostic and/or prognostic non-invasive biomarkers[27–30,33,34.] Glowacki et al. have shown that the level of miR-21–5p in the serum of renal transplant recipients is associated with the severity of fibrosis[16]. Unfortunately, no sera or urine collection was available for our cohort of patients, and the predictive value of either blood or urinary miR-21-5p levels for renal scarring was not tested in the present study. Finally, miR-21-5p is a promising therapeutic target in renal fibrosis. Indeed, miR-21-5p knockout mice develop less renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction compared to wild-type mice[21]. Moreover, administration of antagonist molecules of miR-21-5p successfully prevents the development of renal fibrosis in the unilateral ureteral obstruction[20,21] as well as in the Alport syndrome[35] mouse model. In this context, as no specific treatment is currently available for IgAN, targeted therapy againstmiR-21-5p may be an effective therapeutic option.

In conclusion, this work enabled to assess the involvement of three well-described pro-fibrotic miRNAs: miR-21-5p, miR-199a-5p and miR-214-3p, in the development of renal interstitial fibrosis occurring during IgAN. Among these candidates, miR-21-5p appears to be the most relevant. Its tissue expression significantly increases during development of fibrotic lesions in proportion to their severity and is also associated with renal survival. A prospective study is needed to confirm these data. Mechanistic studies to explore the regulatory pathways involving miR-21-5p, as well as IgAN mouse model will assess the relevance of a therapeutic strategy blockingmiR-21-5p.

Methods

Ethics. This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki, with approval of the local ethic committee (CHU Lille). Renal biopsies were performed as described in our local regular clinical protocol. Informed consent was obtained for biopsy as well as for the use of clinical data and leftover histological material for research.

Patients and clinical features. This was a single center retrospective study. A systematic review of the Pathology Department electronic database from 2002 to 2012 was performed to identify native kidney biopsy specimens with a histological diagnosis of IgAN. Patients with secondary forms of IgAN (Henoch-Schonlein purpura or cirrhosis) were excluded. Patients under renal replacement therapy (dialysis or kidney transplant)at the time of diagnosis were also excluded. Clinical (age, sex, weight, height, blood pressure) and biological (creatininemia, eGFR by MDRD formula, quantitative proteinuria, hematuria defined as > 1+ by dipstick test)data at the time of biopsy were recorded. Treatments (renin angiotensin system blockade, corticosteroids, immunosuppressive agents), as well as evolution of clinical and biological data (at one year after diagnosis and at last follow-up time point) were collected. High blood pressure was defined as systolic blood pressure > 140 mmHg, or diastolic blood pressure > 90 mmHg, or previous antihypertensive drug prescription. Renal failure was defined as eGFR by MDRD < 60 mL/min/1.73 m2. ESRD was defined as requirement for renal replacement therapy or transplantation.

Histopathology. In the population of interest, the available biopsies were systemically reviewed by an experienced renal pathologist (D.B.) in a blind manner. Biopsies were scored according to the MEST criteria of the Oxford classification[10,11]. M score was derived from scoring each glomerulus according to mesangial hypercellularity (< 4 cells per mesangial area = 0, 4–5 cells per mesangial area = 1, 6–7 cells per mesangial areas = 2,≥ 8 cells per mesangial areas = 3). Biopsies were classified as M0 if the mean score of glomeruli was ≤ 0.5, or M1 if the mean score of glomeruli was > 0.5. Endocapillary hypercellularity was classified E0 if absent and E1 if present. Segmental glomerulosclerosis was classified S0 if absent, and S1 if present. Interstitial fibrosis (score T) was estimated semi-quantitatively and classified as T0 if the fibrosis affected up to 25% of the cortical area, T1 between 26and 50%, and T2 beyond 50%. We also recorded extra-capillary proliferation (cellular or fibro-cellular crescent). Vascular lesions were evaluated with arterial lesions (thickness of the intima <or> thickness of the media) and arteriolar lesions (proportion of vessels showing hyalinosis).

Renal expression of miR-21-5p, miR-214-3p and miR-199a-5p. The extraction of total RNA, including miRNAs, was performed with four 10 µ m-slices of paraffin embedded renal biopsies with the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

(Thermofisher). Reverse transcription was performed using theTaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher) with the specific TaqMan probe microRNA Assay (Thermofisher) for miR-21-5p (Assay ID397), miR-199a-5p (Assay ID498) and miR-214-3p (Assay ID517).U6-snRNA (Assay ID1973) was used as reference. Real-time PCR was performed with TaqManUniversal MasterMix II no UNG (Thermofisher) and miRNA specific primers (Thermofisher). The amplification reaction was performed on the device StepOne More Real Time PCR System (Thermofisher). Expression levels of mature miRNAs were calculated based on the comparative threshold cycle method (RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$)[36].

In situ hybridization of miR-21-5p. Paraffin-embedded tissue sections (5 µ m) were dewaxed with xylene and rehydrated in successive ethanol dilution. The sections were permeabilized by incubation in proteinase K (Thermofisher) for 15 minutes at 37 °C. After washing with PBS (Phosphate Buffer Salin) and dehydration, samples were incubated with the miR-21-5p Locked Nucleic Acid probe coupled to digoxigenin 50 nM (Exiqon) for2 h at 45 °C. Slides were rinsed in 5X SSC (Sodium saline Citrate), 1X SSC and 0.2X SSC solutions at the same hybridization temperature and rinsed again with 0.2X SSC at room temperature The reaction was stopped with blocking solution (2% sheep serum, 2 mg/mL bovine serum albumine in PBS + 0.1% Tween 20) for 15 minutes at room temperature. Probe labeling was performed with sheep anti-DIG Fab fragments antibody conjugated to alkaline phosphatase (1/800) (Roche Applied Science). Revelation was carried out by incubation overnight at room temperature in a solution of 5-bromo-4-chloro-3-indyl phosphate and nitroblue tetrazolium (RocheApplied Science) with 0.2 mM levamisole. The color reaction was stopped by washing with 50 mM tris-HCl,150 mM NaCl, 10 mM KCl in RNAse-free water. The sections were counterstained with Nuclear Fast Red to mark cell nuclei. Finally, slides were dehydrated and mounted with Eukitt® (Dutscher).

Immunostaining of α-SMA. On deparaffinized sections, the antigenic sites were unmasked with Trisbuffer EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) at pH 9 for 30 minutes. Immunostaining was performed using the PLC BenchmarkTX (Ventana) and XT ultra13 kit view diaminobenzidine (Ventana). The negative control was performed without the primary antibody. Slides were incubated with PBS containing mouse monoclonal antibody anti-α -SMA diluted at 1/300 (Dako)at 4 °C overnight. The sections

were then incubated with anti-mouse antibody conjugated with peroxidase-labeledpolymer (Dako). Immunoreactive proteins were visualized with a 3-amino-9-ethylcarbazole-containing peroxidase substrate (hydrogen peroxide) (Dako). Finally, the tissue sections were counterstained with hematoxylin.

Statistical analysis. Continuous variables are expressed as mean ± standard deviation or median[min-max]. Qualitative variables are expressed as count (percentage). Statistical significance between groups was assessed using ANOVA, unpaired Student's t-test or non parametric test (Mann–Whitney or Kruskal–Wallis). Correlations between miRNAs renal expression were determined by calculating the Pearson correlation coefficient. Since miRNAs correlated with each other, principal component analysis (PCA) was performed to summarize the pattern of miR-21-5p, miR-199a-5p and miR-214-3p expression. The first principal component (PCAfactor 1) who explained 83% of the variance was used as a measure of miRNA expression pattern in comparative analyses involving the MEST scores.

Renal failure-free survival, defined as ESRD requiring renal replacement, was estimated using the Kaplan-Meier method. We assessed the association of main biological and histological data, and the 3 microRNA with renal failure using the log-rank test for qualitative variables and univariable Cox proportional hazard regression models for continuous variables. For each continuous variable, the proportional hazards assumption was assessed by plotting the Schoenfeld residuals against the rank of survival time[37] and the log-linearity assumption was assessed using Martingale residual plot and supremum test based on a sample of 1000 simulated residualpatterns[38]. As the hypothesis of log-linearity was not reached for serum levels of miRNA, optimal threshold values were determined using the algorithm of maximization of hazard ratio[39]. In view of the study sample size, no multivariable analysis was performed.

Statistical testing was done at the two-tailed α level of 0.05. Statistical analyses were performed using the SPSS

package, version 15.0 for Windows (Chicago, Illinois, USA) and SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

References

1. Schena, F. P. A retrospective analysis of the natural history of primary IgA nephropathy worldwide. Am. J. Med. 89, 209–215 (1990).

2. Xie, J. et al. Predicting progression of IgA nephropathy: new clinical progression risk score. PLoS One 7, e38904 (2012).

3. Kiryluk, K. et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. Nat. Genet. 46, 1187–96 (2014).

4. Moldoveanu, Z. et al. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. Kidney Int. 71, 1148–54(2007).

5. Suzuki, H. et al. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. J. Clin. Invest. 119, 1668–77 (2009).

6. Moura, I. C. et al. Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy. J. Am. Soc. Nephrol. 16, 2667–76 (2005).

7. Magistroni, R., D'Agati, V. D., Appel, G. B. & Kiryluk, K. New developments in the genetics, pathogenesis, and therapy of IgA nephropathy. Kidney Int. 88, 974–89 (2015).

8. Wyatt, R. J. & Julian, B. A. IgA nephropathy. N. Engl. J. Med. 368, 2402–14 (2013).

9. Farris, A. B. & Colvin, R. B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 21, 289–300(2012).

10. Roberts, I. S. et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. Kidney Int. 76, 546–556 (2009).

11. Cattran, D. C. et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. Kidney Int. 76, 534–545 (2009).

12. Coppo, R. et al. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments.Kidney Int. 86, 828–836 (2014).

13. Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res.19, 92–105 (2009).

14. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. Nat. Rev. Genet. 12, 861–874 (2011).

15. Szeto, C. C. & Li, P. K. MicroRNAs in IgA nephropathy. Nat. Rev. Nephrol. 10, 249–56 (2014).

16. Glowacki, F. et al. Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. PLoSOne 8, e58014 (2013).

17. Lino Cardenas, C. L. et al. MiR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. PLoS Genet. 9, e1003291 (2013).

18. Savary, G. et al. MiR-214-3p, a new fibromiR involved in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. Eur. Respir. J. 44 (2014).

19. Pottier, N., Cauffiez, C., Perrais, M., Barbry, P. & Mari, B. FibromiRs: translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. Trends Pharmacol. Sci. 35, 119–26 (2014).

20. 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. Renal Physiol. 301, F793–F801 (2011).

21. Chau, B. N. et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. Sci. Transl. Med. 4, 121ra18 (2012).

22. Dweep, H., Sticht, C., Kharkar, A., Pandey, P. & Gretz N. Parallel analysis of mRNA and microRNA microarray profiles to explore functional regulatory patterns in polycystic kidney disease: using PKD/Mhm rat model. PLoS One 8, e53780 (2013).

23. Denby, L. et al. MicroRNA-214 antagonism protects against renal fibrosis. J. Am. Soc. Nephrol. 25, 65–80 (2014).

24. Van Rooij, E., Purcell, A. L. & Levin, A. A. Developing MicroRNA Therapeutics. Circ. Res. 110, 496–507 (2012).

25. Serino, G., Sallustio, F., Cox, S. N., Pesce, F. & Schena, F. P. Abnormal miR-148b expression promotes aberrant glycosylation of IgA1in IgA nephropathy. J. Am. Soc. Nephrol. 23, 814–24 (2012).

26. Serino, G. et al. Role of let-7b in the regulation of N-acetylgalactosaminyltransferase 2 in IgA nephropathy. Nephrol. Dial. Transplant.30, 1132–9 (2015).

27. Wang, G. et al. Intrarenal expression of microRNAs in patients with IgA nephropathy. Lab. Invest. 90, 98–103 (2010).

28. Wang, G. et al. Elevated levels of miR-146a and miR-155 in kidney biopsy and urine from patients with IgA nephropathy. Dis.Markers 30, 171–9 (2011).

29. Wang, G. et al. Expression of microRNAs in the urinary sediment of patients with IgA nephropathy. Dis. Markers 28, 79–86 (2010).

30. Wang, G. et al. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis. Am. J. Nephrol. 36, 412–8 (2012).

31. Bao, H. et al. Inhibition of miRNA-21 prevents fibrogenic activation in podocytes and tubular cells in IgA nephropathy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 444, 455–60 (2014).

32. McClelland, A. D. et al. MiR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7. Clin. Sci. (Lond.) 129, 1237–49 (2015).

33. Fang, Y. et al. MiR-29c is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF-α activation. Am. J.Physiol. Renal Physiol. 304, F1274–82 (2013).

34. Szeto, C. C. et al. Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. Dis. Markers 33, 137–44(2012).

35. Gomez, I. G. et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. J. Clin. Invest. 125, 141–56 (2015).

36. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(− DeltaDeltaC(T)) Method. Methods 25, 402–8 (2001).

37. Schoenfeld, D. Partial residuals for the proportional hazards regression model. Biometrika 69, 239–241 (1982).

38. Lin, D. Y., Wei, L. J. & Ying, Z. Checking the Cox Model with Cumulative Sums of Martingale-Based Residuals. Biometrika 80,

557–572 (1993).

39. Contal, C. & O'Quigley, J. An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. Comput.Stat. Data Anal. 30, 253–270 (1999).

Acknowledgements

This study was supported by Santelys association and CHRU Lille. The authors gratefully acknowledge BrigitteHémon for her excellent technical assistance. The authors also thank Rose-Mary Siminski and Marie-HélèneGevaert (Laboratoire d'histologie, Université de Lille) for their technical assistance.

Author Contributions

M.-F.H. participated in recruiting the patients, collected the data and the histologic samples, performed PCR, in situ hydridization and immunochemistry, and participated in writing the main manuscript. D.B. participated in designing the study and performed

histological analyses. C.V.d.H. and G.S. participated in performing research. V.G. performed histological analyses, and took the pictures of biopsies samples. Z.J. participated in recruiting the patients and collecting data. N.P. participated in writing the manuscript. E.D. performed the statistical analysis. C.N. participated in recruiting the patients. C.C. participated in designing the study, performing research and writing the manuscript. F.G. participated in designing the study, recruiting the patients and writing the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.