

IDENTIFICATION DE MICROARNS IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT
DES CARCINOMES RÉNAUX

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES ET DE LA
RECHERCHE EN VUE DE L'OBTENTION DE LA MAITRISE ÈS SCIENCE,
BIOCHIMIE

SONIA DASTOUS

DÉPARTEMENT DE CHIMIE ET BIOCHIMIE

FACULTÉ DES SCIENCES

UNIVERSITÉ DE MONCTON

02/2017

ProQuest Number: 10906271

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



ProQuest 10906271

Published by ProQuest LLC (2018). Copyright of the Dissertation is held by the Author.

All rights reserved.

This work is protected against unauthorized copying under Title 17, United States Code
Microform Edition © ProQuest LLC.

ProQuest LLC.
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106 – 1346

REMERCIEMENT

Cette étude n'aurait pas été possible sans le support moral, les conseils reçus et l'amour ressenti à mes côtés. Ces mots ne décrivent pas ma gratitude envers toutes les personnes qui ont fait de cette histoire et cette aventure ce qu'elle est.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse Dre Sandra Turcotte, pour m'avoir guidée et faite confiance depuis le début de ce projet. Merci infiniment.

Je remercie également mes parents et mes amies qui m'ont encouragée et accompagnée tout au long de mon parcours.

Merci aux membres de mon comité consultatif et de mon jury de thèse pour leur temps et suggestions pour cette étude.

Pour sa collaboration et sa contribution lors du séquençage à haut débit, je remercie Nicolas Crapoulet. De plus, je tiens à remercier l'Institut Atlantique de la recherche sur le cancer (IARC) et son équipe pour leur aide et le partage de leur expertise.

Cette étude n'aurait pas été possible sans le soutien de l'Université de Moncton, plus spécifiquement le Département de chimie et biochimie, ainsi que la Fondation de recherche en santé du Nouveau-Brunswick pour le financement de ce projet.

Enfin, merci aux membres de l'équipe Turcotte pour votre support, votre amitié et les bons souvenirs.

SOMMAIRE

Introduction. Le cancer du rein est le 8^e cancer le plus fréquemment diagnostiqué au Canada. Parmi ceux-ci, les carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCC) représentent la majorité des cas. Les tumeurs rénales sont asymptomatiques et environ 30% des patients présentent des métastases au premier diagnostic. À un stade avancé, ces tumeurs sont réfractaires à la chimiothérapie conventionnelle et malgré le développement des thérapies ciblées, il n'y a pas de traitement curatif pour les ccRCC métastatiques. Une caractéristique des ccRCCs est l'inactivation du gène de suppression tumoral von Hippel-Lindau (VHL) qui est observé dans plus de 80% des cas. Une meilleure compréhension de ces tumeurs permettra d'améliorer la détection et le développement des thérapies ciblées pour les ccRCCs. Les microARNs (miARNs) sont des petits ARNs non codants qui régulent négativement l'expression des gènes. Alors qu'ils sont impliqués dans différents processus physiologiques, le dérèglement de leur expression a été associé avec le développement de plusieurs maladies dont le cancer.

Objectifs. Les objectifs de cette étude sont : i) identifier des miARNs dont la régulation est dépendante de l'expression du gène VHL ii) déterminer si les miARNs sélectionnés sont régulés par le facteur induit en hypoxie (HIF) iii) reconnaître les cibles potentielles de ces miARNs.

Méthodes. Le séquençage à haut débit a été utilisé pour établir un profil d'expression de miARNs dont l'expression varie en fonction du niveau de VHL dans les cellules de RCC. Une cohorte de 34 patients ayant un RCC muté pour VHL provenant de la base de données TCGA a été utilisée pour corroborer nos résultats *in vitro*. Les miARNs sélectionnés ont été validés par RT-qPCR à l'aide de sondes Taqman. Des shARNs contre HIF-1 α et HIF-2 α ont été utilisés pour étudier la régulation de ces miARNs par l'hypoxie. De plus, une baisse d'expression de miR-2355 a été réalisée à l'aide du système CRISPR/Cas9. Finalement, les bases de données miRWalk et DAVID 6.8 ont été utilisées pour identifier des voies de signalisation et des cibles potentielles de miARNs.

Résultats. Nous avons identifié 183 miARNs dont l'expression varie en fonction de VHL. Parmi ceux-ci, 22 furent sélectionnés et validés dans trois différents modèles de ccRCC in vitro (RCC4, RCC10 et 786.0 déficientes en VHL comparativement aux mêmes cellules dont le gène VHL a été stablement réintroduit). Ces données ont été comparées à une cohorte de 34 patients ayant un ccRCC et une mutation identifiée sur le gène VHL. Une variation de l'expression pour 32 miARNs a été observée entre les cellules et les patients de la cohorte et les miARN-2355, -155, -1271 et -197 ont été sélectionnés pour des études subséquentes. Nos résultats indiquent que l'expression de miR-155 et miR-1271 serait régulée par HIF-1 α et HIF-2 α tandis que l'expression de miR-2355 et miR-197 serait régulée seulement par HIF-2 α . L'utilisation du CRISPR/Cas9 pour diminuer l'expression du miR-2355 combinée au séquençage et à l'utilisation de bases de données nous a permis d'identifier les gènes PTGDR, KIR3DL2, EBF2, UBASH3A, KCNT1, PRKAR2B et SUS4 comme cibles potentielles pour ce miARN dont l'expression est à la hausse dans 97,06% des patients atteints de ccRCCs.

Conclusion. Cette étude identifie des miARNs dont l'expression est dépendante de VHL, lesquels pourraient mener à l'identification de nouvelles cibles pour le développement de nouvelles thérapeutiques pour les RCC. Les résultats de cette étude ont été soumis à la revue Oncotarget en février 2017.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE D'ABBRÉVIATIONS	xi
AVANT-PROPOS	xv
1.0 INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer et ses caractéristiques.....	2
1.1.1 Autosuffisance en signaux de croissance.....	3
1.1.2 Insensibilité aux signaux anti-croissance.....	4
1.1.3 Évasion de l'apoptose	4
1.1.4 Potentiel répliatif illimité	6
1.1.5 Activation de l'angiogenèse et formation de métastases	6
1.1.6 Autres caractéristiques importantes des cellules cancéreuses.....	7
1.2 Le cancer du rein	8
1.2.1 Les carcinomes rénaux papillaires (pRCC) (10-15% des cas).....	13
1.2.2 Les carcinomes rénaux chromophobes (10% des cas).....	14
1.2.3 Le syndrome Birt-Hogg-Dubé	14
1.2.4 Les carcinomes rénaux rares	15
1.2.5 Les carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCCs) (75-80% des cas).....	15
1.3 Le gène VHL et la maladie von Hippel-Lindau	16
1.4 Le gène VHL	18
1.4.1 La régulation du facteur de transcription HIF par VHL	19
1.4.2 Les sous-unités HIF- α	21
1.5 Traitement des ccRCCs.....	22
1.6 Les microARNs.....	25
1.6.1 Histoire des miARNs	25
1.6.2 Biogénèse des miARNs	26
1.6.3 Mécanisme d'action	29
1.6.4 Les miARNs et le cancer	29
1.6.5 Identification de miARNs chez les RCCs.....	30
1.6.6 miARNs dont l'expression varie en fonction du niveau de VHL.....	31

1.6.7	Les miARNs comme potentiel thérapeutique	32
2.0	OBJECTIFS	33
3.0	RÉSULTATS	35
3.1	Résumé	37
3.2	Abstract	38
3.3	Introduction	39
3.4	Results	42
3.4.1	Deep sequencing to identify VHL-regulated miRNAs in ccRCC	42
3.4.2	Identification of clinically relevant VHL-regulated miRNAs by TCGA	42
3.4.3	pVHL regulates miR-210, -155, -2355 and -197 in a HIF-dependent manner	43
3.4.4	Signaling pathways affected by VHL inactivation in 786.0 cells and ccRCC patients	45
3.4.5	Knockout of miR-2355 by the CRISPR-Cas9 system and deep sequencing to identify miR-2355-5p regulated genes	46
3.4.6	MirWalk prediction combined with data analyses to identify miR-2355-5p targeted genes	46
3.5	Discussion	48
3.6	Materials and methods	52
3.6.1	Cell culture	52
3.6.2	Stable transfection for HIF-2 α knockdown	52
3.6.3	microRNA profiling by Next-Generation Sequencing	52
3.6.4	mRNA sequencing using Ion Torrent	53
3.6.5	Identification of VHL mutated ccRCC patients in cBioPortal	54
3.6.6	TCGA miRNA and mRNA data analysis	54
3.6.7	RNA isolation and Quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR)	55
3.6.8	miRNA isolation and TaqMan qRT-PCR	55
3.6.9	Western blot assay	56
3.6.10	CRISPR Knockout	57
3.6.11	T7 endonuclease assay	57
3.6.11	Statistical analysis	58
4.0	DISCUSSION	77

RÉFÉRENCES.....87

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Les caractéristiques d'une tumeur.....	2
Figure 1.2. Mosaïque de cellules retrouvée chez une tumeur.....	3
Figure 1.3. Les gènes identifiés chez les RCCs et leurs rôles dans la réponse au niveau d'oxygène, de fer et d'énergie cellulaire.....	12
Figure 1.4. Le gène VHL et la protéine pVHL.....	18
Figure 1.5. La régulation de HIF en condition normoxique et hypoxique.....	20
Figure 1.6. Thérapies ciblées couramment utilisées pour le traitement de ccRCCs avancés et métastatiques.....	23
Figure 1.7. La biogénèse des miARNs.....	28
Figure 3.1. miRNAs profiling in RCC4 and RCC4/VHL cells by Next-Generation Sequencing.....	58
Figure 3.2. Identification and validation of clinically relevant miRNA.....	61
Figure 3.3. VHL-regulated miRNAs are dependent of the HIF- α subunit.....	63
Figure 3.4. Identification of clinically relevant deregulated genes in ccRCC.....	65
Figure 3.5. CRISPR-Cas9 targeting miR-2355 identified regulated genes in ccRCC....	67
Figure 3.6. Identification of miR-2355 potential targets in VHL-inactivated tumors.....	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Classification des RCCs et leurs sous-types	9
Tableau 1.2. Classification TNM des RCCs	11
Tableau 1.3. Phénotype de la maladie VHL et de ces sous-types.....	17
Tableau 3.1. Clinicopathological characteristics of 34 TCGA RCC patients.....	71
Tableau 3.2. VHL AA mutations type in a cohort of N=34 RCCs.....	72
Tableau 3.3. Clinically relevant VHL-dependant microRNAs.....	73
Tableau 3.4. KEGG Pathways of deregulated 607 genes in 786.0 VHL -/-	74
Tableau 3.5. Predicted deregulated targets	75
Tableau 3.6. MiRNA-2355 predicted targets fold change expression in ccRCC	76

LISTE D'ABBREVIATIONS

ADRP	Protéines liées à la différenciation adipeuse
AGO	Argonaute
AMPK	Protéine kinase 5' activée par l'adénosine monophosphate
ARNse	Ribonucléase
BHD	Birt-Hogg-Dubé
BNIP3	BCL2/ adénovirus E1B 19kDa interagissant avec la protéine 3
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
CCND1	Cycline D1
CUL2	Culline 2
DGCR8	Sous-unité du complexe de microprocesseur DGCR8 (région chromosomique 8 du syndrome de DiGeorge)
EBF2	Facteur tôt 2 des cellules B (Early B-cell factor 2)
EGF	Facteur de croissance épidermique
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
ccRCC	Carcinomes rénaux à cellules claires
chRCC	Carcinomes rénaux chromophobes
FH	Fumarate déshydrogénase
FLCN	Folliculine
GTP	Guanine triphosphate
GLUT1/SLC2A1	Transporteur de glucose 1

HB	Hémangioblastomes
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
HIF- α	Facteur de transcription induit en hypoxie
HK1/2	Hexokinase
HLRCC	Léiomyomatose héréditaire avec adénocarcinome rénal
KCNT1	Sous-famille des canaux activé par le sodium et potassium, membre 1
KIR3DL2	Récepteur analogue de l'immunoglobuline des lymphocytes NK (Tueuse naturelle)
LDHA	Lactate déshydrogénase A
MET	Proto-oncogene MET, récepteur à tyrosine Kinase
Min	Minutes
miARN/miR	MicroARN
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
MMPs	Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
mTORC1	Complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
PHD1-3	Prolyl-hydroxylase1-3
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PFKL	Phosphofructokinase

PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1
pRCC	Carcinomes rénaux papillaires
PRKAR2B	Sous-unité régulatrice IIB de la protéine kinase A
PTGDR	Récepteur de la prostaglandine D2
RBX1	Protéine Ring-Box 1
RB1	Protéine associée au rétinoblastome 1
RCC	Carcinomes rénaux
SDHAF2	Facteur 2 d'assemblage du complexe de la succinate déshydrogénase
SDHB	Sous-unité B du complexe de la succinate déshydrogénase
SDHC	Sous-unité C du complexe de la succinate déshydrogénase
SDHD	Sous-unité D du complexe de la succinate déshydrogénase
shARN	ARN court en épingle à cheveux
SK1	Spingosine Kinase 1
SUSD4	Protéine 4 contenant un domaine sushi
TCA	Cycle d'acide tricarboxylique (cycle de Krebs)
TGF- β	Facteur de croissance transformant- β
TRBP :	TAR (HIV-1) RNA Binding Protein 2
TSC	Sclérose tubéreuse
μ M	Micromolaire
μ L	Microlitre

UBASH3A	Protéine A ubiquitine-associé contenant un domaine SH3
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'épithélium vasculaire
VHL	Von Hippel-Lindau
WNT	Famille du site d'intégration MMTV sans aile, member 1

AVANT-PROPOS

Cette thèse ne suit pas le format traditionnel implanté par l'Université de Moncton mais plutôt le format d'une thèse par article.

Cette étude a mené à l'écriture d'un article intitulé « *Identification of miR-2355 by microRNA profiling in VHL-inactivated Renal Cell Carcinomas* ». La section résultats est une copie authentique de l'article qui sera soumis avant la fin du dépôt final. Elle sera présentée en anglais afin de faciliter sa publication. Par contre, l'introduction, les objectifs et la discussion générale de la thèse seront présentés en français, tel que décrit dans le guide prescrit par la Faculté des Études Supérieures et de la Recherche de l'Université de Moncton. De plus, toutes les références sont regroupées à la fin de cette thèse afin de faciliter sa lecture.

Les expériences décrites dans le manuscrit, à l'exception du séquençage à haut débit, ont été effectuées et analysées par moi-même sous la supervision de Dr. Sandra Turcotte. La structure et la mise au point des expériences ont été conçues et supervisées par Sandra Turcotte. Finalement, l'écriture de l'article fut un travail d'équipe entre ma superviseuse et moi.

1.0 INTRODUCTION

1.1 Le cancer et ses caractéristiques

Le cancer est une maladie qui débute lorsqu'une cellule possède une croissance incontrôlée menant à sa prolifération et éventuellement à la formation d'une tumeur maligne. Le terme latin *cancer*, provient du terme grec *karkinos*, qui fut utilisé par le physicien Hippocrate en 460-370 (Av. J.-C.) pour décrire les carcinomes. Le premier cas de cancer rapporté est un cancer du sein provenant de l'Égypte ancienne en 1500 A.D. (Sudhakar, 2009).

La transformation d'une cellule normale à une cellule cancéreuse implique plusieurs altérations qui provoquent le débalancement des processus de prolifération et d'homéostasie de la cellule. Ces altérations incluent notamment des mutations (héréditaires ou sporadiques), une perte d'hétérozygotie, un réarrangement génétique et/ou des changements épigénétiques. Une accumulation de ces altérations amène des changements de caractéristiques physiologiques de la cellule telles qu'une autosuffisance en signaux de croissance, une insensibilité aux signaux anti-croissance, un potentiel réplcatif illimité, une évacion de l'apoptose et une angiogénèse maintenue menant à la formation de métastases (Figure .11) (Hanahan & Weinberg, 2000).



Figure 1.1. Les caractéristiques d'une tumeur. Figure adaptée de (Hanahan & Weinberg, 2000). Une cellule nécessite plusieurs altérations afin de survivre et proliférer. Ces caractéristiques sont essentielles pour la formation, le développement et la croissance des tumeurs.

Même si le cancer origine d'une cellule, il est important de noter qu'une tumeur est formée d'une mosaïque de divers types cellulaires qui agissent en harmonie, afin de promouvoir sa croissance (Figure 1.2).

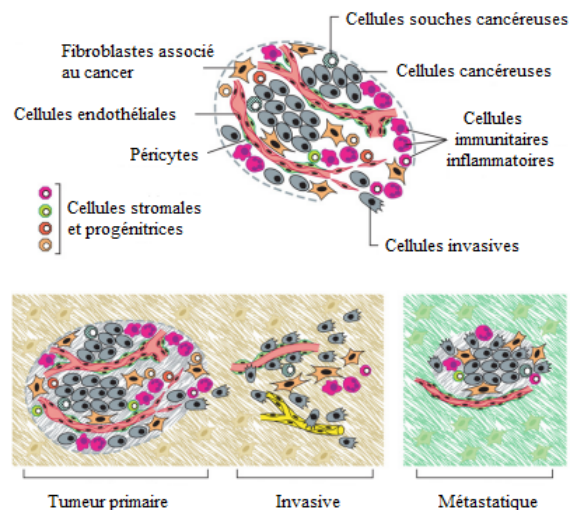


Figure 1.2. Mosaïque de cellules retrouvée chez une tumeur. Figure adaptée (Hanahan & Weinberg, 2011). Les cellules doivent communiquer via leur microenvironnement et agir ensemble afin de soutenir la prolifération rapide des cellules cancéreuses et conséquemment la croissance de la tumeur. Au fur et à mesure que la tumeur croît, son microenvironnement et les cellules adjacentes changeront pour fournir ses besoins.

1.1.1 *Autosuffisance en signaux de croissance*

La croissance cellulaire est un processus très régulé. D'abord, une cellule a besoin de signaux (facteurs mitogènes) lui permettant de passer d'un état de repos à un état de prolifération. Par contre, les cellules cancéreuses peuvent échapper à ces signaux pour arriver à contrôler leur prolifération et conséquemment leur croissance. Ceci peut survenir lors d'une augmentation de la production de facteurs de signaux de croissance (EGF, TGF, PDGF), une stimulation des cellules normales adjacentes à produire des facteurs de croissance, une augmentation de l'expression des récepteurs de facteurs de croissance ainsi qu'une activation constitutive des cascades de signalisation (Witsch, Sela, & Yarden, 2010).

1.1.2 Insensibilité aux signaux anti-croissance

En plus de la régulation des facteurs mitogènes, plusieurs signaux antiprolifératifs sont présents dans l'environnement des cellules et régulent négativement la croissance en maintenant la cellule dans un état de repos. Par contre, les cellules cancéreuses peuvent perturber ces signaux et favoriser un état de croissance. Par exemple, la dérégulation des inhibiteurs de croissance a également été observée dans le cancer (McClatchey & Yap, 2012). De plus, un déséquilibre des cascades de réparation de dommage à l'ADN (Levine, 1997) et de production du facteur de croissance transformant (TGF- β) mènent à des défauts dans le contrôle du cycle cellulaire et des signaux anti-croissance (Mukherjee, Winter, & Alexandrow, 2010). Habituellement, la régulation négative par ces signaux se déroule lors de la phase G1 du cycle cellulaire qui est régulée par la protéine Rétinoblastome (RB1) (Giacinti & Giordano, 2006). Le gène RB1 a été le premier gène identifié comme étant suppresseur de tumeur (Knudson, 1971).

1.1.3 Évasion de l'apoptose

La croissance d'une population de cellules est régulée par une balance entre son taux de croissance et son taux de mortalité. L'apoptose (ou mort programmée des cellules) est un processus physiologique activé par différents stress et signaux qui provoque des modifications morphologiques, biochimiques et structurales à la cellule menant à sa destruction complète et sans trace (Elmore, 2007). Plus précisément, lorsqu'une cellule entre en apoptose les changements morphologiques observables sont la condensation du cytosol, la ségrégation de la chromatine et la formation d'invaginations ou de bourgeons à partir des membranes. Ceux-ci permettront la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules environnantes, habituellement dans une période d'environ 24 heures (Elmore, 2007; Wyllie, Kerr, & Currie, 1980). Le lien entre le cancer et l'apoptose fut suggéré en 1972 par Kerr, Wyllie et Currie.

L'apoptose induit également des modifications biochimiques bien caractérisées qui peuvent être divisées en deux mécanismes d'action référés comme la voie extrinsèque et intrinsèque. La voie extrinsèque est déclenchée lors de la liaison d'un ligand extracellulaire, notamment le ligand Fas et le facteur de nécrose tumoral (TNF- α) à leur récepteur membranaire (FasR, TNFR1). Cette liaison permettra l'activation et la formation du complexe de signalisation induisant la mort (DISC) composé des molécules FADD et de la procaspase-8. L'activité protéolytique de la procaspase-8 est responsable du clivage et l'activation de la procaspase-3, l'effecteur majeur du processus apoptotique. D'un autre côté, la voie intrinsèque est stimulée par des signaux envoyés à la cellule provenant entre autres d'un manque en facteurs de croissance, d'une diminution de la concentration en oxygène (hypoxie) ou de la présence d'hormones ou de cytokines. Ces signaux mèneront à la perméabilisation des membranes mitochondriales provoquant le relargage du cytochrome c dans le cytosol, la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases effectrices menant à la mort de la cellule. La perméabilisation des membranes mitochondriales est un processus hautement régulé par la famille de protéines Bcl-2 (Elmore, 2007).

Aujourd'hui, des études démontrent que la radiothérapie et plusieurs agents chimiothérapeutiques induisent l'apoptose afin d'éliminer les cellules cancéreuses. Certains types de cancer, tels que les cancers hématologiques et les tumeurs solides malignes de l'enfant, répondent très bien à la chimiothérapie. Par contre, les tumeurs adultes ont tendance à développer une résistance à ces agents cytotoxiques. De plus, ceux-ci ne ciblent pas seulement les cellules cancéreuses et leur potentiel thérapeutique est également limité par les effets secondaires sur les cellules normales (Hannun, 1997). La radiothérapie, quant à elle, induit des dommages à l'ADN irréparables, menant à la mort éventuelle de la cellule. (Baskar, Lee, Yeo, & Yeoh, 2012)

1.1.4 Potentiel réplcatif illimité

L'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-croissance et l'évasion de l'apoptose confèrent, ensemble, l'immortalité et un potentiel d'une croissance illimitée à la cellule. Cependant, les études de Hayflick ont permis de découvrir que les cellules possèdent un nombre limité de réplcations, habituellement entre 60-70 doublements (in vitro) (Hayflick, 1997; Wyllie et al., 1980). À chaque cycle cellulaire, environ 50 à 100 paires de bases sont perdues des régions protectrices des chromosomes, les télomères, menant à une diminution progressive de ceux-ci, à une perte de leur fonction et éventuellement à la mort de la cellule. Une augmentation des enzymes de maintenance des télomères, nommés les télomérases (TERT et TERC), est observée chez la majorité des cellules cancéreuses conférant à ces cellules un potentiel réplcatif illimité (Cao, Bryan, & Reddel, 2008; Shay & Bacchetti, 1997).

1.1.5 Activation de l'angiogenèse et formation de métastases

Lors du développement et de la croissance d'un tissu, la formation de vaisseaux sanguins est un processus très régulé. La ramification de nouveaux vaisseaux à partir d'un vaisseau déjà existant est appelée angiogenèse. Une angiogenèse bien maintenue est nécessaire pour la croissance des tumeurs et pour la formation de métastases. Ceci assure la survie des cellules en permettant l'apport de nutriments et d'oxygène ainsi que l'évacuation de déchets métaboliques (ex. CO₂). Dans le corps humain, chaque cellule doit se trouver à environ 100µm d'un capillaire pour survivre (Jain, Au, Tam, Duda, & Fukumura, 2005). En absence d'angiogenèse, la concentration en oxygène au centre des tumeurs diminue et place les cellules en conditions hypoxiques menant à la mort du tissu par nécrose ou apoptose (Hanahan & Folkman, 1996; Parangi et al., 1996).

Afin de pouvoir survivre, la cellule cancéreuse va stimuler la production de nouveaux vaisseaux sanguins en augmentant la production du facteur de croissance de l'épithélium vasculaire (VEGF). La sécrétion de ce facteur va, par la suite, stimuler les cellules endothéliales à produire des métalloprotéinases (MMPs) permettant la dégradation de la matrice extracellulaire et la migration des cellules. Il est à noter que la présence des facteurs d'adhésion, notamment les intégrines et les cadhérines, sont également nécessaires pour la ramification de vaisseaux sanguins (Mizejewski, 1999; Nelson, Fingleton, Rothenberg, & Matrisian, 2000).

Éventuellement, les cellules cancéreuses vont acquérir des capacités invasives qui leur permettront de migrer vers les tissus adjacents localement ou coloniser des organes distants par les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Malheureusement, la formation de métastase est la cause de 90% des mortalités reliées au cancer (Sporn, 1996).

1.1.6 Autres caractéristiques importantes des cellules cancéreuses

En plus de celles énumérées ci-haut, d'autres caractéristiques ont été associées au développement d'une cellule cancéreuse telles la reprogrammation du métabolisme (Pavlova & Thompson, 2016), l'évasion du système immunitaire (Melvold & Sticca, 2007), et l'inflammation (DeNardo, Andreu, & Coussens, 2010). La reprogrammation du métabolisme est un processus très étudié dans plusieurs types de cancer. En plus des processus et caractéristiques décrites, la reprogrammation du métabolisme de la cellule va se produire afin de lui fournir l'énergie nécessaire pour proliférer. Sous condition normoxique (aérobie), une cellule formera son pyruvate à partir du glucose, un processus appelé la glycolyse. Celui-ci est ensuite utilisé comme source d'énergie dans les mitochondries, résultant dans la production de dioxyde de carbone et d'eau. Par contre, en condition hypoxique (ou anaérobie) les cellules se tournent vers la production de lactate. Chez une cellule cancéreuse, le métabolisme favorise la production de ce dernier malgré la présence d'oxygène, un phénomène caractérisé par Otto

Warburg (Warburg, 1956a, 1956b). De plus, des études démontrent que le lactate produit par les cellules cancéreuses peut se diffuser à travers la membrane et dans le microenvironnement afin de nourrir les cellules adjacentes et promouvoir la croissance tumorale (Goodwin, Gladden, Nijsten, & Jones, 2014; Hirschhaeuser, Sattler, & Mueller-Klieser, 2011; Romero-Garcia, Moreno-Altamirano, Prado-Garcia, & Sanchez-Garcia, 2016).

En plus d'une reprogrammation métabolique, on observe également des changements au niveau du transport des métabolites. Par exemple, une augmentation dans l'expression des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) a été observée chez le cancer de l'endomètre et du sein leur permettant un apport continu de glucose (Krzeslak et al., 2012).

1.2 Le cancer du rein

Le cancer est la cause principale de décès au Canada. Il touche 2 Canadiens sur 5 annuellement ce qui représente 202 400 nouveaux diagnostics et 78 800 décès. Les cancers le plus fréquemment diagnostiqués sont le poumon, le colon, le sein chez la femme et la prostate chez l'homme. Au Canada, le cancer du rein est le 8^e type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué. Mondialement, il représente 338 000 nouveaux cas et 143 000 décès chaque année (Znaor, Lortet-Tieulent, Laversanne, Jemal, & Bray, 2015). Il en existe plus d'une cinquantaine de types et sous-types, comportant chacun leurs propres morphologies et anomalies génétiques (Tableau 1.1). Le risque de développer le cancer du rein au cours de sa vie est de 1.8%. C'est une maladie qui touche plus d'hommes (67%) que de femmes et l'âge moyen du diagnostic est de 63 ans (Karakiewicz et al., 2008; Society, 2016). Avec le vieillissement de la population, on peut s'attendre à une augmentation de son taux d'incidence au cours des prochaines années. Bien qu'il soit difficile d'établir les causes exactes de son développement, les facteurs de prédisposition au cancer du rein sont principalement l'obésité, le tabagisme, l'insuffisance rénale et l'hypertension. Comme pour d'autres types de cancer, une

alimentation saine et la pratique régulière d'activité physique permettent de prévenir le développement de tumeurs rénales (Chow, Dong, & Devesa, 2010).

Tableau 1.1. Les sous-types des carcinomes rénaux. Adapté de (Moch, Cubilla, Humphrey, Reuter, & Ulbright, 2016)

Types des carcinomes rénaux (RCCs)
Carcinomes rénaux à cellules claires (70-75%)
Carcinomes rénaux papillaires (10-15%)
Carcinomes rénaux chromophobes (5-10%)
Oncocytomes (5%)
Carcinomes rénaux kystique multiloculaire (1-4%)
Léiomyomatose héréditaire et carcinomes rénaux (<1%)
Carcinomes rénaux des tubes collecteurs (1%)
Carcinome rénaux médullaire (<1%)
Carcinome rénaux associé à une translocation MiT/TFE (<1%)
Carcinomes rénaux déficiente en succinate deshydrogénase (SDH) (<1%)
Carcinome tubulo-mucineux à cellules fusiformes (<1%)
Carcinomes rénaux tubulo-kystiques (<1%)
Carcinomes rénaux associés à la maladie kystique rénale acquise (<1%)
Carcinomes rénaux papillaires à cellules claires (<1%)
Carcinomes rénaux inclassables (<1%)
Adénome papillaire (<1%)

Les carcinomes rénaux « Renal Cell Carcinoma » ou RCC représentent jusqu'à 90% des diagnostics de cancer de rein. La classification des différents types de RCC est basée sur leur histologie. Les principaux types sont les carcinomes rénaux à cellules claires ccRCC (75%), les carcinomes rénaux papillaires pRCC (10-15%), les carcinomes rénaux chromophobes chRCC (10%) et les oncocytomes (5%). D'autres types ont été ajoutés à cette classification mais demeurent rares. Bien que les tumeurs rénales surviennent généralement de façon sporadique, elles peuvent également être transmises de façon héréditaire dans 2-3% des cas (Znaor et al., 2015).

Pour les patients dont le RCC est diagnostiqué au début de la maladie (pT1-pT2) (Tableau 1.2), une néphrectomie partielle ou totale peut être curative (Cohen & McGovern, 2005). La taille de la tumeur, l'âge et la condition du patient sont

des facteurs qui peuvent influencer la décision entre une néphrectomie partielle ou totale. L'amélioration des techniques de chirurgie permet une intervention moins invasive afin de préserver une partie du rein lors de la néphrectomie partielle. Les taux de survie après 5 ans peuvent atteindre 90%. Malheureusement, les patients atteints d'un RCC n'ont aucun symptôme et il n'existe aucun biomarqueur pour détecter la maladie de façon précoce. Ainsi, près d'un tiers des patients ont déjà des métastases au moment de leur diagnostic (pT4). De plus, les patients atteints de tumeurs pT3 développeront une récurrence entre 17 à 28 mois suite à la néphrectomie. La détection de la tumeur primaire est souvent faite par la métastase. Le taux de survie après 5 ans pour les patients ayant un RCC métastatique est seulement 10%. Ces patients survivront en moyenne 13 mois (Cairns, 2010). De plus, 30-40% des patients atteints d'une tumeur localisée ou invasive lors du diagnostic développeront une récurrence entre 38 à 45 mois suite à la néphrectomie (Chin, Lam, Figlin, & Belldegrun, 2006; Lam, Leppert, Belldegrun, & Figlin, 2005; Motzer, Bander, & Nanus, 1996).

Tableau 1.2. La classification TNM des RCCs. Adapté de (WHO, 2004)

Types des carcinomes rénaux (RCCs)			
T- tumeur primaire			
TX - Tumeur ne peuvent pas être évaluée			
T0 - aucune évidence de tumeur primaire			
T1 - Tumeur sous 7cm, limité au rein			
T1a - Tumeur sous 4cm			
T1b - Tumeur entre 4 et 7 cm			
T2 - Tumeur plus de 7 cm, limité au rein			
T3 - Tumeur invasive (Veines majeurs, glandes surrénales et tissus périnéphrétiques)			
T3a - Tumeur Invasive (glandes surrénales et tissus périnéphrétique)			
T3b - Tumeur invasive (Veines et veine cave, sous le diaphragme)			
T3c - Tumeur invasive (Veine cave jusqu'en haut du diaphragme)			
T4 - Tumeur invasive (Fascia rénal)			
N - Ganglions lymphatiques			
NX - Ganglions lymphatiques ne peuvent pas être évalué			
N0 - Aucune tumeur dans les ganglions lymphatiques locaux			
N1 - Métastases dans un ganglion lymphatique			
N2 - Métastases dans plus qu'un ganglion lymphatique			
M - Métastases distantes			
MX - Métastases distantes ne peuvent pas être évalué			
M0 - Aucune métastase			
M1 - Métastases dans les organes distants			
Stade I	T1	N0	M0
Stade II	T2	N0	M0
Stade III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stade IV	T4	N0,N1	M0
	T1, T2, T3, T4	N2	M0
	T1, T2, T3, T4	N0,N1,N2	M1

Au cours des 15 dernières années, le développement des études de séquençage a permis d'identifier au moins 7 gènes pouvant être impliqués dans le développement des RCCs. Ces tumeurs sont décrites comme étant une maladie métabolique puisque les mutations affectant les différents gènes sont associées aux processus métaboliques. Des mutations et des modifications épigénétiques bien décrites affectent le gène von Hippel-Lindau (VHL) chez les ccRCC alors que des altérations sur le proto-oncogène MET et sur la fumarate hydratase (FH) mèneront au développement de pRCC. De plus, les analyses provenant de l'atlas du génome des cancers (The Cancer Genome Atlas TCGA) identifient des mutations sur des gènes associés à des modifications de la chromatine dont ceux de la protéine polybromo-1 (PBRM1), l'histone méthyltransférase SETD2, et l'ubiquitine carboxyl-terminale BAP1 chez les ccRCC et pRCC alors que celles affectant les gènes de la neurofibromatose de type 2 (NF2), le facteur 2 du facteur nucléaire

érythroïde 2 (Nrf2) et l'inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines 2A (CDKN2A) sont rapportées chez les pRCC. Les modifications sur le gène de la folliculine (FLCN) rapportés chez les patients ayant le syndrome Birt-Hogg-Dubé (BHD) ont été associées aux chRCC. Finalement, les gènes TSC1 et TSC2 pour les patients atteints de la sclérose tubéreuse (TSC) et les gènes SDHB/SDHC/SDHD chez les tumeurs déficientes en succinate déshydrogénase (SDH) sont parmi les gènes affectés chez les patients atteints de RCCs de formes héréditaires (Figure 1.3).

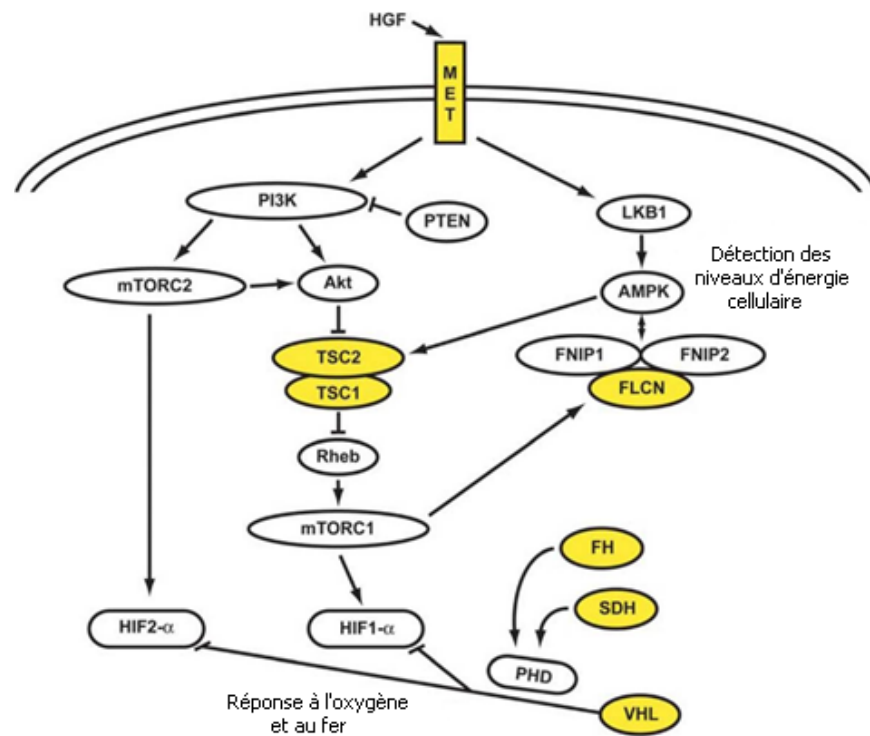


Figure 1.3. Les gènes identifiés chez les RCCs et leurs rôles dans la réponse au niveau d'oxygène, de fer et d'énergie cellulaire. Figure adaptée de (Linehan, Srinivasan, & Schmidt, 2010). Le gène VHL est responsable de l'ubiquitination de protéines destinées pour le protéasome, une réaction dépendante de la présence d'oxygène et de fer. La détection des niveaux d'énergie cellulaire est affectée par MET, un gène codant pour un récepteur de surface spécifique pour les facteurs de croissance HGF. La liaison du ligand à son récepteur mène à la phosphorylation de protéines et conséquemment à l'activation de la cascade AMPK. TSC1/TSC2, codant pour la tuberine, est une GTPase qui est également impliquée dans la détection des niveaux d'énergie par la voie AMPK via la régulation négative de mTOR. Le cycle TCA et la production d'énergie par phosphorylation oxydative sont affectés par FH et SDH.

1.2.1 Les carcinomes rénaux papillaires (pRCC) (10-15% des cas)

Les pRCCs sont divisés en 2 sous-types selon leur morphologie, soit type I et II (Delahunt & Eble, 1997). Des mutations sur le gène MET caractérisent les tumeurs de type I qui sont associées à un meilleur pronostic et une plus longue survie. MET est un récepteur de tyrosine kinase responsable de la liaison aux facteurs de croissance impliqués dans la prolifération, la survie et l'inhibition de l'apoptose (Horie et al., 1999). D'autre part, environ 25% des tumeurs papillaires de type II présentent des mutations sur le gène CDKN2A. Les tumeurs de type II sont plus hétérogènes et habituellement de stade, de grade et fréquence plus élevée que ceux de type I (Delahunt et al., 2001; Lubensky et al., 1999). Comme mentionné précédemment, des mutations sur les gènes SETD2, BAP1 et PBRM1 aussi impliqués dans le développement de ccRCC, ont été observés chez les pRCCs. Il existe également des pRCCs à cellules claires qui sont formés de cellules épithéliales, arrangées dans des tubules et des papilles (Tickoo et al., 2006). Elles représentent jusqu'à 5% des tumeurs rénales et surviennent de façon sporadique dans les patients atteints de maladies rénales chroniques (Rohan et al., 2011; Zhou et al., 2014).

Les pRCCs peuvent aussi apparaître de façon héréditaire. Ces patients sont prédisposés au développement de pRCC multiples et bilatéraux. Ces maladies sont appelées carcinomes rénaux papillaires héréditaires de type I (HPRCT), la léiomyomatose héréditaire avec adénocarcinome rénal (HLRCC) et la sclérose tubéreuse (TSC). Les patients atteints de HPRCT ont une mutation sur le gène MET et sont prédisposés au développement de pRCCs de type I (Zbar et al., 1994). Pour sa part, la HLRCC est une maladie dominante familiale caractérisée par le développement de léiomyomes et de tumeurs rénales papillaires de type II. Cette maladie est associée à la mutation du gène de la fumarate hydratase (FH), une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs qui mène à une augmentation des niveaux de HIF- α et caractérisée comme une forme de tumeur très agressive (Sudarshan et al., 2011; Tomlinson et al., 2002). Les cellules de ces tumeurs sont

majoritairement caractérisées par une structure de type papillaire, un gros noyau et une région péri-nucléaire claire (Merino, Torres-Cabala, Pinto, & Linehan, 2007)

La maladie héréditaire dominante de la sclérose tubéreuse (TSC) est due à une mutation sur les gènes TSC1 et TSC2. Ces patients sont prédisposés au développement de tumeurs bénignes de la peau et du cerveau et souffrent fréquemment de cancers rénaux. Ces tumeurs rénales peuvent être multifocales et bilatérales de type ccRCC, pRCC ou chRCC (Cheadle, Reeve, Sampson, & Kwiatkowski, 2000).

1.2.2 Les carcinomes rénaux chromophobes (10% des cas)

Les RCCs chromophobes (chRCC) ont été décrits pour la première fois en 1985 (Thoenes, Storkel, & Rumpelt, 1985). Ces tumeurs ont une taille médiane de 6 cm et sont associées à une perte des chromosomes 2, 10, 13, 17 et 21 chez 93%, 93%, 87%, 90% et 70% des patients, respectivement (Kovacs, Soudah, & Hoene, 1988; Yusenko, 2010). De plus, aucune mutation sur le gène VHL n'a été détectée chez les chRCCs malgré leur histologie similaire au ccRCC, soit un cytoplasme clair (Kenck, Wilhelm, Bugert, Staehler, & Kovacs, 1996).

1.2.3 Le syndrome Birt-Hogg-Dubé

Les patients atteints du syndrome Birt-Hogg-Dubé ont une mutation sur le gène BHD codant pour la folliculine, une cible du complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTORC1) et de la protéine kinase 5' activée par l'adénosine monophosphate (AMPK) (Toro et al., 2008). Ceci mène à une prédisposition au ccRCC, chRCC, oncocytomes et plus rarement les pRCC (da Silva et al., 2003; Khoo et al., 2003)

1.2.4 Les carcinomes rénaux rares

Il existe d'autres types de RCCs, mais plus rares. Les carcinomes des tubes collecteurs, qui sont des tumeurs très agressives, sont caractérisés par une perte des chromosomes q1, 6p, 13q et 21q (Polascik et al., 1996). Il existe aussi des RCCs déficients en SDH (SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2) menant à un défaut dans le complexe mitochondriale 2. Cette caractéristique permet la distinction de ce type de tumeurs en observant une faible coloration des cellules par immunohistochimie contre SDHB (Gill et al., 2014; Ricketts et al., 2008).

1.2.5 Les carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCCs) (75-80% des cas)

Les ccRCCs constituent la forme la plus diagnostiquée des cancers du rein. Ce sont des tumeurs qui se développent dans le cortex rénal, plus spécifiquement dans les tubes proximaux. Les cellules de ces tumeurs ont un cytoplasme clair, dû au contenu élevé en gouttelettes lipidiques riches en cholestérol, phospholipides et lipides neutres, et elles ont un noyau rond ou ovale (Moch et al., 2016). Des ossifications et calcifications dans les zones nécrotiques sont également présentes chez 10-15% des patients (Fukuoka et al., 1987). Le pronostic pour les ccRCC dépend majoritairement du stade et du grade de la tumeur. Malgré que la multicentricité soit très rare chez les ccRCC, une multi-focalité est rapportée chez 4% des cas de ccRCCs (Cheng, Farrow, & Zincke, 1991; Kletscher, Qian, Bostwick, Andrews, & Zincke, 1995).

Environ deux tiers des patients atteints de ccRCC ont une inactivation bi-allélique du gène VHL dû à des mutations ou une hyperméthylation de son promoteur (Dalglish et al., 2010; Dulaimi et al., 2004). Par contre, plusieurs autres mutations sur le chromosome 3p, notamment sur les gènes PBRM1, BAP1 et SETD2, ont aussi été rapportées récemment, tout comme des mutations affectant le gène mTOR, un régulateur central du métabolisme, de la croissance et de la survie de la cellule (Brugarolas, 2014; Laplante & Sabatini, 2012; Morris & Latif, 2016). Moins fréquemment, des mutations ont été identifiées sur le gène

TET2, une enzyme impliquée dans la méthylation de l'ADN, le facteur de transcription TP53, et les gènes PTEN et PIK3CA (Brugarolas, 2014; Fenner, 2013).

1.3 Le gène VHL et la maladie von Hippel-Lindau

Le nom VHL fut donné en 1936 suite à des descriptions des cas d'angiomes rétiniens par Eugen von Hippel en 1904 et des hémangioblastomes cérébraux et spinaux en 1927 par Arvid Lindau. Le lien entre la maladie et le gène VHL a été découvert par clonage positionnel en 1993 (Latif et al., 1993). Des mutations touchant un seul allèle du gène VHL sont à l'origine de la maladie VHL, une maladie autosomique dominante affectant 1 personne sur 36 000 (Maher, Yates, & Ferguson-Smith, 1990). Ces personnes sont prédisposées au développement de plusieurs types de tumeurs bénignes tels que des kystes au niveau des reins et du pancréas mais aussi des hémangioblastomes (HB) du système nerveux central et de la rétine, des phéochromocytomes et des ccRCC. Les symptômes de la maladie débutent entre 10 et 40 ans et l'espérance de vie médiane pour ces patients est de 49 ans (Karsdorp et al., 1994; Neumann & Wiestler, 1994). Il existe 2 sous-types de la maladie VHL, soit de type 1 ou de type 2 (2a, 2b, 2c), qui sont caractérisés par la présence ou l'absence de phéochromocytomes (Tableau 1.3).

Tableau 1.3. Phénotype de la maladie VHL et de ces sous-types. (Lonser et al., 2003).

Type	Phénotype
Type 1	Hémangioblastomes réiniens Hémangioblastomes du SNC Carcinomes Rénaux Néoplasmes et kystes pancréatiques
Type 2A	Phéochromocytomes Hémangioblastomes réiniens Hémangioblastomes du SNC
Type 2B	Phéochromocytomes Hémangioblastomes réiniens Hémangioblastomes du SNC Carcinomes Rénaux Néoplasmes et kystes pancréatiques
Type 2C	Phéochromocytomes

Une autre maladie causée par le gène VHL est la polyglobulie Tchouvache. Ces patients ne développent aucun RCC. C'est une maladie récessive très rare (fréquence 0.001377 (E. Liu et al., 2004)) qui a été décrite en 1997 chez 103 individus dans une région en Russie centrale (Sergeyeva et al., 1997). C'est seulement en 2002 qu'une mutation spécifique du codon 200 (C598T – ARG 200TRP) du gène VHL a été associée ce type de polyglobulie (Ang et al., 2002). Cette mutation a été étudiée chez les souris et les poissons zèbres mutants pour R200W VHL^{-/-} qui démontrent aussi des symptômes de la polyglobulie (Hickey, Lam, Bezman, Rathmell, & Simon, 2007; van Rooijen et al., 2009).

1.4 Le gène VHL

Le gène VHL (Figure 1.4), se retrouve sur le chromosome 3p25 (Kohno, Sekine, Tobisu, Oshimura, & Yokota, 1993). Il possède trois exons et deux codons de méthionine se traduisant par deux isoformes de la protéine pVHL, soit une de 213 acides aminés (30kDa) et l'autre de 140 acides aminés (19kDa). Le gène VHL est ubiquitaire et est particulièrement exprimé dans les cellules épithéliales de la peau, le tractus gastro-intestinal, urogénital et respiratoire, ainsi que les glandes endocrines et exocrines (Corless, Kibel, Iliopoulos, & Kaelin, 1997; Sakashita et al., 1999). Une étude effectuée sur des cellules souches embryonnaires de souris démontre que des souris hétérozygotes pour VHL se développent normalement alors que des souris n'exprimant pas le gène (VHL $-/-$) meurent in utero entre 10.5 et 12.5 jours de gestations (Gnarra et al., 1997). L'introduction du gène VHL fonctionnel chez des cellules déficientes en VHL n'a aucun effet *in vitro*, par contre, ses fonctions de suppression tumorale ont été décrites *in vivo* par Kaelin et son équipe qui ont observé que la réintroduction du gène VHL prévenait la formation de ccRCC chez la souris (Gossage, Eisen, & Maher, 2015; Iliopoulos, Kibel, Gray, & Kaelin, 1995).

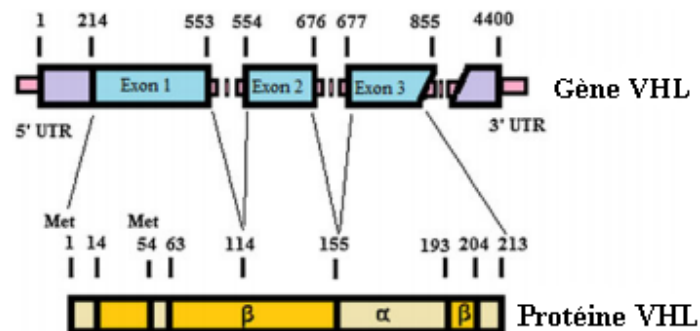


Figure 1.4. Le gène VHL et la protéine pVHL. Figure adaptée de (Arjumand & Sultana, 2012). Le gène VHL est composé de 3 exons et code pour une protéine de 140 ou 213 acides aminés avec un poids moléculaire de 19 ou 30 kDa, selon l'isoforme. La protéine contient un domaine acide (codons 1-54), un domaine alpha qui permet la liaison à l'élongine et un domaine beta qui est responsable de la liaison aux hydroxy-prolines.

Le rôle le mieux caractérisé pour VHL est sans aucun doute la régulation de la dégradation des facteurs induits par l'hypoxie (HIF- α) via le protéasome (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Néanmoins, VHL est aussi impliqué dans plusieurs autres processus qui sont HIF-indépendants, tels que l'assemblage de la matrice extracellulaire (Kurban et al., 2008; Kurban, Hudon, Duplan, Ohh, & Pause, 2006; Ohh et al., 1998), la régulation des jonctions intracellulaires (Furge et al., 2007), la signalisation NF- κ B (Yang et al., 2007), la régulation de p53 (Roe et al., 2006), la stabilité des microtubules (Hergovich, Lisztwan, Barry, Ballschmieter, & Krek, 2003), le maintien des cils cellulaires (Thoma et al., 2007), la sénescence cellulaire (Welford, Dorie, Li, Haase, & Giaccia, 2010; Young et al., 2008), la régulation de WNT (Chitalia et al., 2008), l'ubiquitination de l'ARN polymérase II (Mikhaylova et al., 2008) et la dégradation des récepteurs adrénergiques β 2 (Xie et al., 2009). De plus, VHL a été montré pour jouer un rôle dans les processus d'autophagie (Mikhaylova et al., 2012; Turcotte et al., 2008).

1.4.1 La régulation du facteur de transcription HIF par VHL

Les tumeurs dont le volume est supérieur à 1 mm³ possèdent des régions hypoxiques. Le manque d'approvisionnement en oxygène amènera des zones nécrotiques jusqu'à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui apportera l'oxygène et les nutriments. L'hypoxie est une condition également observée lors d'ischémie locale comme dans le cas d'un arrêt cardiovasculaire ou d'une ischémie rénale. Malgré sa contribution dans plusieurs pathologies, des faibles niveaux d'hypoxie sont présents dans le corps. Par exemple, les niveaux d'oxygène dans un tissu diminuent en s'éloignant des poumons créant ainsi un gradient d'oxygène très important pour le développement du corps. Une faible concentration d'oxygène permet aussi la stimulation de l'embryogénèse, la cicatrisation et le maintien de la pluripotence des cellules souches (Koh & Powis, 2012; Pouyssegur, Dayan, & Mazure, 2006).

Les facteurs de transcription induits en hypoxie (HIF-1 α , HIF-2 α) (14q23.2, 2p21) ont été découverts en 1992 lors d'une étude portant sur l'augmentation d'érythropoïétine (EPO) dans le rein et le foie de rats en réponse à l'hypoxie en démontrant que l'augmentation d'EPO est le résultat de la liaison du facteur de transcription HIF dans une région spécifique du promoteur (Semenza & Wang, 1992). Rapidement dégradé en présence d'oxygène, la sous-unité α des HIFs est stabilisée lors d'un stress hypoxique. Ceci permet sa liaison avec HIF- β pour former le facteur de transcription retrouvé au noyau (Figure 1.5).

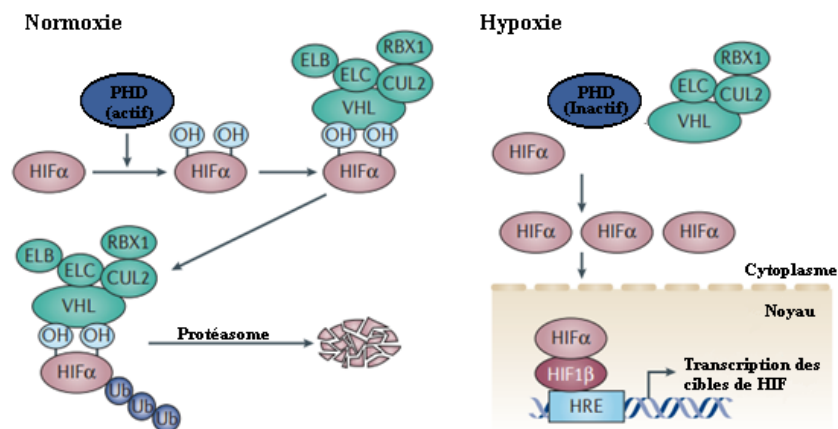


Figure 1.5. La régulation de HIF en condition normoxique et hypoxique. Figure adaptée de (Gossage et al., 2015). En normoxie, les prolyl hydroxylases et le complexe formé de VHL-élongine B et C et de la culline-2 (VBC-cul2) régule l'expression de HIF- α via le protéasome en inhibant la transcription de ces cibles. Lors d'un stress hypoxique, HIF- α est stabilisé et migre au noyau activant la transcription de nombreux gènes hypoxiques. Chez les ccRCCs contenant une mutation du gène VHL, HIF- α est constitutivement exprimé permettant à la cellule de maintenir un état d'hypoxie menant à des changements métaboliques, à une prolifération rapide et une angiogenèse soutenue promouvant la croissance tumorale.

La régulation du facteur HIF a fait l'objet de nombreuses études au cours des années 2000. Il a été démontré qu'en présence d'oxygène, HIF-1 α et HIF-2 α , subissent une hydroxylation (-OH) sur les résidus prolines 402 et 564 pour HIF-1 α et les prolines 405 et 531 pour HIF-2 α par les prolyl-hydroxylases (PHD1-3) (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Cette réaction est catalysée par la présence

d'oxygène, d' α -cétoglutarate (Schofield & Ratcliffe, 2004), d'ascorbate (Knowles, Raval, Harris, & Ratcliffe, 2003) et de fer (Maxwell et al., 1999). L'hydroxylation de ces résidus permet la reconnaissance de HIF par le complexe multi-protéique VBC-Cul2 qui inclut pVHL, l'élongine B, l'élongine C, la culline-2 et la protéine Rbx1 (Clifford et al., 2001; Nguyen, Yang, Fribourgh, Wolfe, & Xiong, 2015). Ce complexe possède une activité E3-ubiquitine ligase qui permet la polyubiquitination de HIF et conséquemment sa dégradation via le protéasome (Kaelin, 2002). La dégradation de HIF- α en présence d'oxygène est très rapide et sa demi-vie est < 5 minutes (Huang, Gu, Schau, & Bunn, 1998). Par contre, lorsque la concentration en oxygène diminue, les PHDs cessent de fonctionner et HIF ne peut plus être dégradé. Ceci mène à l'expression constitutive et à la stabilisation de HIF- α dans la cellule permettant ensuite sa migration vers le noyau où il se dimérise avec la sous unité HIF- β qui est constitutivement exprimée (Semenza, 2012). Une fois dimérisé, ce facteur de transcription se lie à une séquence consensus (5'-ACGTG-3') menant à l'activation de plus de 1000 gènes impliqués dans divers processus cellulaires dont l'angiogenèse, la glycolyse, l'apoptose, la prolifération et la survie cellulaire (Schodel et al., 2011; Wenger, Stiehl, & Camenisch, 2005).

Pour sa part, pVHL comprend deux domaines, soit un α et un β . Le domaine α est nécessaire pour la liaison aux élongines B et C qui elles, sont responsable de la liaison à la cullin-2 permettant de nucléer le complexe. Le domaine β de VHL, quant à lui, sert à la reconnaissance de protéines hydroxylées comme HIF grâce aux deux sites de reconnaissance d'hydroxyproline conservés (Hon et al., 2002; Min et al., 2002). L'inactivation du gène VHL qui se produit dans de plus 80% des cas de ccRCCs prévient la reconnaissance entre HIF et le complexe VBC-Cul2 provoquant la stabilisation de HIF et l'activation de la réponse hypoxique.

1.4.2 Les sous-unités HIF- α

HIF-1 α et HIF-2 α démontrent environ 50% d'homologies entre elles et sont toutes les deux régulées par la concentration en oxygène. Alors que certains gènes

et miARNs peuvent être régulés par les deux sous-unités dont l'anydrase carbonique 9 (CAIX), GLUT1 et miR-210, il a été démontré que HIF-1 α et HIF-2 α pouvaient avoir des rôles distincts dans la cellule. Par exemple, HIF-1 α serait plutôt lié à la régulation de la transcription en réponse à l'hypoxie et au métabolisme (LDHA, BNIP3, PGK1) alors que HIF-2 α serait d'avantage impliqué dans la régulation de l'angiogenèse (VEGF, TGF- α), l'invasion (SK1) et le cycle cellulaire (CCND1)(C. Chen, Pore, Behrooz, Ismail-Beigi, & Maity, 2001; Hu, Wang, Chodosh, Keith, & Simon, 2003; Iyer et al., 1998; Raval et al., 2005; Salama et al., 2015; Shinojima et al., 2007).

Des études réalisées par les groupes de Kaelin et Simon en 2005 démontrent que HIF-2 α serait la sous-unité importante pour le développement des tumeurs rénales. Son potentiel en tant que suppresseur de tumeur fut étudié in vivo par siRNA (Kondo, Kim, Lechpammer, & Kaelin, 2003; Raval et al., 2005). De plus, chacune des isoformes démontrent des effets opposés sur la croissance des ccRCCs in vivo (Shen et al., 2011). En effet, une surexpression de HIF-1 α semblerait plutôt liée à une réduction de la croissance tumorale. D'autre part, une étude démontre qu'une réexpression de HIF-3 α chez les 786.0 mène à une augmentation de HIF-2 α et conséquemment une réduction de tumeurs in vivo. Ainsi, les ccRCCs sporadiques peuvent être divisés en 2 types, soit H1H2, qui est caractérisé par la surexpression de HIF-1 α et HIF-2 α (H1H2) ou H2, qui surexprime HIF-2 α seulement (H2) (Gordan et al., 2008).

1.5 Traitement des ccRCCs

Une des premières stratégies pour éliminer les tumeurs localisées est la néphrectomie partielle ou totale. Le taux de survie après 5 ans est élevé pour ces patients. Malheureusement, 20 à 40% des patients développent une récurrence dans les 2-4 ans suivant la néphrectomie (Chae, Kim, Kim, Bae, & Cho, 2005; Griffin, Gore, & Sohaib, 2007; Patel & Sokhi, 2012). Lorsque la tumeur est détectée à un stade avancé, la chimiothérapie et les thérapies ciblées demeurent la

meilleure option. Malheureusement, seulement 10% des patients atteints de ccRCC de stade avancé ou métastatique répondent aux traitements de chimiothérapie (Rini, Campbell, & Escudier, 2009). Ces patients doivent alors se tourner vers des thérapies ciblées (Figure 1.6).

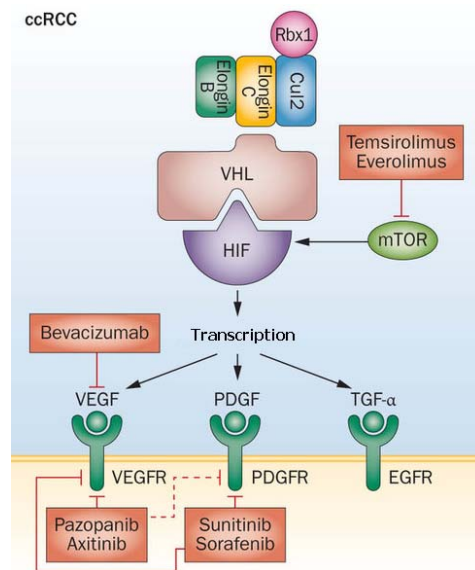


Figure 1.6. Thérapies ciblées couramment utilisées pour le traitement de ccRCCs avancés et métastatiques. Figure adaptée de (Linehan & Srinivasan, 2013). Ces agents chimiothérapeutiques ciblent principalement les voies hypoxiques notamment le VEGF (bevacizumab), le VEGFR et le PDGFR (sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib) et aussi la voie mTOR (temsirolimus et évérolimus).

Le développement des thérapies ciblées se penche sur l'inhibition de deux voies, soit la sérine/théronie kinase mTOR qui est impliquée dans la prolifération cellulaire ainsi que les facteurs angiogéniques et leurs récepteurs. Parmi ceux-ci on retrouve, le temsirolimus et l'évérolimus qui sont deux inhibiteurs de mTOR alors que le bevacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, ciblant l'activité pro-angiogénique des cellules cancéreuses. Notons que le temsirolimus et le bevacizumab sont moins utilisés puisque ceux-ci doivent être injectés chaque semaine et leur efficacité est moindre qu'avec d'autres agents.

Le sunitinib, le sorafénib, le pazopanib et l'axitinib sont des inhibiteurs des récepteurs au VEGF et au PDGF, visant à diminuer l'activité angiogénique des cellules endothéliales entourant les tumeurs. Le premier agent utilisé en clinique est habituellement le sunitinib. Lorsque les tumeurs ne répondent pas à ce traitement, les patients sont généralement traités avec l'évérolimus. Le pazopanib est aussi couramment utilisé. Ce traitement a souvent comme but de réduire la taille des tumeurs localisées qui, par la suite, pourront être enlevées par une néphrectomie partielle ou totale. L'axitinib est également utilisé pour diminuer la grosseur de la tumeur permettant une néphrectomie, mais celui-ci est plutôt utilisé pour des stades avancés métastatiques. Bien que ces traitements démontrent une certaine efficacité, les tumeurs développent une résistance à la plupart de ces agents et ultimement, la tumeur continue de progresser. Il est important de noter qu'il n'existe pas de traitement curatif pour les RCCs métastatiques (Linehan & Srinivasan, 2013).

En plus de ces thérapies ciblées, l'aldesleukin (Interleukine-2) et l'interféron sont deux traitements immunothérapeutiques offerts pour les patients atteints de RCCs métastatiques. Malgré le fait que ces traitements demeurent toxiques, l'interleukine-2 est encore utilisé en clinique puisque jusqu'à 8% des patients ont une rémission (Fisher, Rosenberg, & Fyfe, 2000; Fyfe et al., 1995). Plus récemment, l'immunothérapie a connu un essor important dans la maladie du cancer. Notre système immunitaire est constitué de cellules T qui ont la capacité de différencier les cellules normales des cellules tumorales. Il a été démontré que les cellules cancéreuses expriment une protéine de mort programmé appelée PD-L1 qui est un antigène tumoral. La liaison de PD-L1 à deux récepteurs immunologiques appelés PD1 et B7-1 empêche la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Des agents inhibiteurs de cette liaison dont le nivolumab sont présentement en essais cliniques chez les ccRCCs (Motzer et al., 2015).

Malgré le développement des thérapies ciblées, le taux de survie des patients atteints de ccRCC métastatiques après 5 ans demeurent aux alentours de 10%. Ceux-ci visent principalement les cellules endothéliales et non les cellules tumorales directement. Nous avons préalablement démontré que cibler l'inactivation de VHL, une mutation rapportée dans plus de 80% des cellules cancéreuses rénales, pourrait mener à une stratégie thérapeutique prometteuse (Turcotte et al., 2008). Une meilleure compréhension de la pathogenèse des RCCs est cruciale pour l'amélioration ou le développement de nouvelles méthodes de détections et de thérapies ciblées.

1.6 Les microARNs

Les microARNs (miARNs) sont des ARNs non-codant d'environ 19-23 nucléotides (Carmell & Hannon, 2004) qui ont comme rôle la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Plus de 2588 miARNs ont été identifiés et répertoriés sur miRBase (www.mirbase.org) (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Ils sont impliqués dans différents processus physiologiques dont la différenciation, l'apoptose et le développement. C'est en 2002 que leur rôle dans le cancer fut démontré lorsque miR-15 et miR-16 ont été observés dans la majorité de patients atteints de leucémie (Calin et al., 2002). Depuis, leur dérégulation a été démontrée dans plusieurs types de cancer (Calin & Croce, 2006). Ces molécules peuvent agir en tant qu'oncogène (He et al., 2005) ou en tant que suppresseur de tumeurs (Johnson et al., 2005).

1.6.1 Histoire des miARNs

L'histoire des miARNs débute en 1974 par les travaux de Sydney Brenner qui, en étudiant le développement de *Caenorhabditis elegans*, a découvert un mutant hétérochronique (*lin-4*) qui était incapable de pondre des œufs (Brenner, 1974; R. Lee, Feinbaum, & Ambros, 2004). Ce phénotype a par la suite été associé à une mutation dans le gène *lin-4* (e912) (Horvitz & Sulston, 1980). Puis, une mutation

découverte sur le gène *lin-14* a démontré un phénotype opposé à celui associé à *lin-4* (Ambros & Horvitz, 1984). Il peut même inverser le phénotype associé à une mutation *lin-4* chez *C.elegans* (Ferguson, Sternberg, & Horvitz, 1987) suggérant une interaction dans lequel *lin-4* régule négativement *lin-14*.

Ce n'est que vers les années 1993 qu'il a été démontré que *lin-4* ne code pas pour une protéine mais plutôt pour deux transcrits de 22 et 61 nucléotides (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Une deuxième publication identifie ensuite que la région 3'UTR de *lin-14* comprend 7 nucléotides complémentaires à ceux de *lin-4* (Wightman, Ha, & Ruvkun, 1993). Ces deux études ont permis de découvrir le mécanisme post-transcriptionnel par lequel *lin-4* régule négativement les effets de *lin-14*.

Quelques années plus tard, le gène *lethal-7* (*let-7*) codant pour un transcrit de 22 nucléotides a été identifié et associé à une sous-expression de sa cible *lin-41* (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Quelques mois plus tard, *let-7* a été identifié chez plusieurs espèces incluant les homosapiens (Pasquinelli et al., 2000). Ces découvertes sont supportées par d'autres études démontrant que les miARNs sont de petits ARNs conservés qui sont présents chez les invertébrés et les mammifères (Lagos-Quintana, Rauhut, Lendeckel, & Tuschl, 2001; Lau, Lim, Weinstein, & Bartel, 2001; R. C. Lee & Ambros, 2001).

1.6.2 Biogénèse des miARNs

La majorité des miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II (Y. Lee et al., 2004) en pri-miR (>1kb) (X. Cai, Hagedorn, & Cullen, 2004). Ces pri-miRs contiennent une coiffe en 5' (5'-cap), ils sont polyadénylés et leur maturation est un processus contrôlé et séquentiel (Y. Lee, Jeon, Lee, Kim, & Kim, 2002). Un pri-miR peut produire un seul miARN ou un «cluster» de miARNs, un groupe de même famille contenant 2 miARNs ou plus. Par la suite, le pri-miR est clivé en pré-miR (~65 nt) par une enzyme de 160kDa appelée Drosha, (Y. Lee et al., 2003)

en présence de son cofacteur essentiel DGCR8, aussi connue sous le nom de Pasha (Denli, Tops, Plasterk, Ketting, & Hannon, 2004; Gregory et al., 2004). Cette première étape de maturation s'effectue dans le noyau. Le pré-miR est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5 qui forme un complexe de transport avec la protéine nucléaire GTPase Ran (Bohnsack, Czaplinski, & Gorlich, 2004; Lund, Guttinger, Calado, Dahlberg, & Kutay, 2004; Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2003). Le pré-miR subit ensuite une deuxième maturation par l'endonucléase ARNase III, Dicer, pour former un miARN mature double-brin d'en moyenne 22 nucléotides (Figure 1.7) (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001).

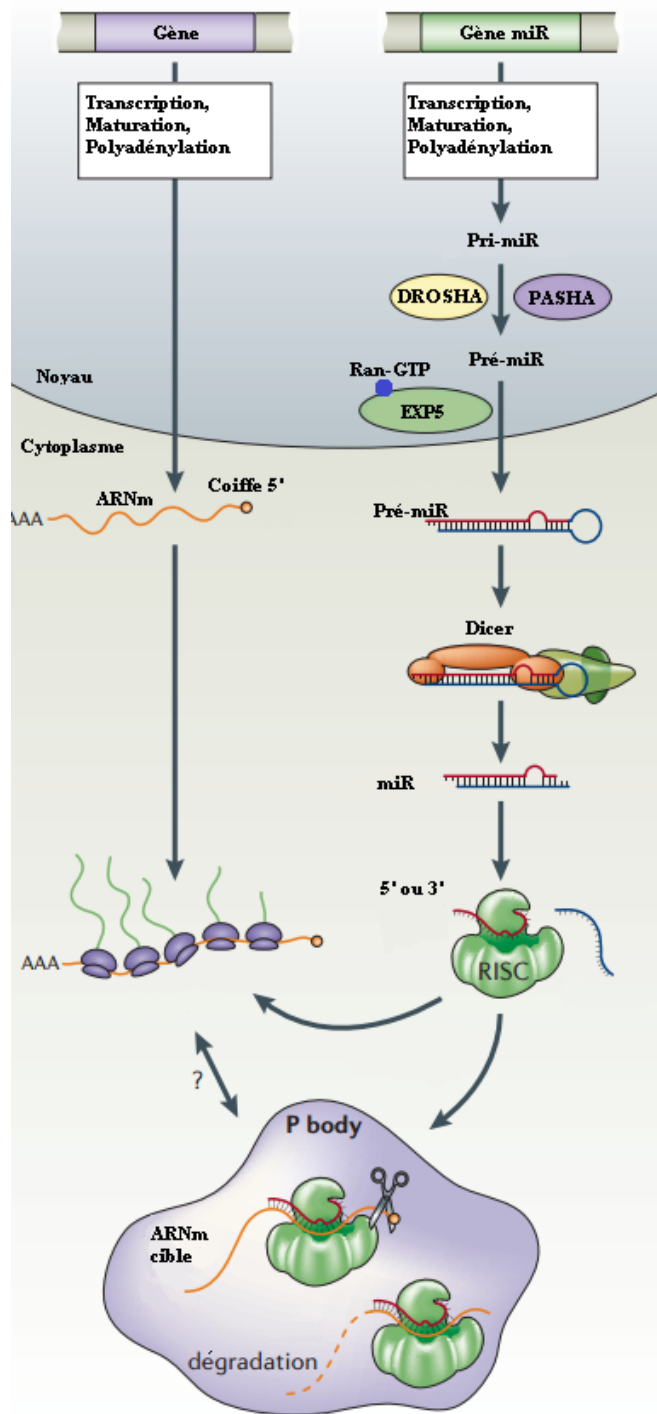


Figure 1.7. La biogénèse des miARNs. Figure adaptée de (Kosik, 2006). La biogénèse des miARNs est un processus comportant plusieurs étapes de synthèse, de maturation et de transport nécessitant l'action de plusieurs enzymes. Une fois mature, le miARN s'incorpore et guide le complexe RISC permettant l'inhibition de sa cible.

1.6.3 Mécanisme d'action

Une fois mature, les miARNs doivent s'incorporer dans un complexe pour effectuer l'inhibition de la traduction d'ARNm en protéine. Pour se faire, la protéine DICER1 (200kDa) s'associe avec la protéine de liaison à l'ARN TAR du VIH-1 (TRBP), une protéine qui contient trois domaines de liaison à l'ARN double brin. Celui-ci permet la liaison de DICER à l'ARN double-brin et aux protéines Argonautes (AGO1, AGO2, AGO3 ou AGO4) afin de former le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (Chendrimada et al., 2005). Les protéines AGO servent à la sélection et à la liaison d'un seul brin du miARN mature, soit le 5' ou le 3', afin de guider le complexe. Le complexe RISC guidé par le miARN se lie à un ARNm par complémentarité Watson-Crick menant à la dégradation ou à l'inhibition de sa traduction. Une complémentarité parfaite entre ces deux mène au clivage et à la dégradation de l'ARN, alors qu'une complémentarité entre les nucléotides 2 à 8 de la région « seed », permet la répression de sa traduction en protéine. Le tout se passe dans les organelles appelées « P-bodies », des foyers dans le cytoplasme induit par la diminution génique au niveau post-transcriptionnel (Gregory, Chendrimada, Cooch, & Shiekhattar, 2005; J. Liu, Valencia-Sanchez, Hannon, & Parker, 2005). Par contre, ces foyers ne sont pas nécessaires pour l'inhibition et la dégradation de l'ARNm. (Eulalio, Behm-Ansmant, Schweizer, & Izaurralde, 2007).

1.6.4 Les miARNs et le cancer

Des défauts dans plusieurs étapes de la synthèse des miARNs ont été observés durant le développement du cancer. Par exemple, une mutation dans le gène miR-128b (miR-128-2) inhibe la maturation du pri-miR-128b résultant dans une diminution des niveaux de sa forme mature. Le résultat est une résistance aux glucocorticoïdes dans le cas de la leucémie lymphoblastique de type MLL-AF4 (Kotani et al., 2010). En plus des altérations génomiques, la dérégulation des miARNs dans une tumeur peut être le résultat d'oncogènes ou de suppresseur de tumeurs qui contrôlent la transcription des pri-miRs. Par exemple, l'oncogène

MYC active la famille de miR-17-92 dans les neuroblastomes (Dews et al., 2006; O'Donnell, Wentzel, Zeller, Dang, & Mendell, 2005; Schulte et al., 2008). Des modifications épigénétiques peuvent également contribuer à la dérégulation des miARNs (Guil & Esteller, 2009).

Une dérégulation des enzymes de maturation comme DROSHA a également été observée chez certains cancers, notamment dans le cancer du col utérin (Muralidhar et al., 2011), le cancer de l'estomac (Tchernitsa et al., 2010) et le cancer du sein (Avery-Kiejda, Braye, Forbes, & Scott, 2014; Passon et al., 2012). Des mutations et des dérégulations dans l'expression de DGCR8 et DICER sont également observées menant à une diminution des niveaux globaux de miARNs dans les tumeurs de Wilms et de la prostate (Belair et al., 2015; Torrezan et al., 2014; Walz et al., 2015). En plus des altérations durant la maturation des miARNs, leur export hors du noyau peut également être perturbé. Des mutations sur l'exportine-5 ont été identifiées dans le cancer du côlon et de l'estomac (Melo et al., 2010). Ces mutations résultent dans un défaut dans l'export des pré-miRs et conséquemment une diminution des niveaux de sa forme mature.

1.6.5 Identification de miARNs chez les RCCs

Plusieurs miARNs ont été identifiés comme étant surexprimés chez les ccRCC tels que miR-7, -21, -23b, -155, -224, -590 et -210. De même, une sous-expression des miARNs -30c, -30d, -34a, -99a, -138, -200c, -584 a été rapportée (Li et al., 2015). Une corrélation a été observée entre les niveaux de méthylation de miR-9 et miR-126 et le développement de métastases (Hildebrandt et al., 2010; Khella et al., 2015). De plus, le miR-451 a une corrélation inverse avec le pronostic de patients atteints de RCCs (Zhu, Huang, & Su, 2016).

1.6.6 *miARNs dont l'expression varie en fonction du niveau de VHL*

Puisque VHL joue un rôle important dans le développement des ccRCCs, l'identification de miARNs dépendants de VHL est également d'intérêt. Une étude a démontré, par micropuce, la sous-expression des miARNs-720, -31, -663, -21 tandis que miR-210, -155, -193b et la famille de miARNs-17-92 étaient surexprimés chez des cellules RCC déficientes en VHL comparativement à leurs contreparties ayant un gène VHL fonctionnel (Neal, Michael, Rawlings, Van der Hoek, & Gleadle, 2010).

En plus de ce profil, d'autres études démontrent le rôle de VHL dans la régulation de miARNs et leurs effets sur différents processus. Par exemple, miR-210 qui est régulé par HIF- α , joue un rôle dans la prolifération, la migration et l'invasion des RCCs ainsi qu'autres types de cancer (Nakada et al., 2011; Qin, Furong, & Baosheng, 2014; Redova et al., 2013). D'autre part, une étude réalisée par l'équipe de Czyzyk-Krzeska démontre que le miR-204 joue un rôle dans la prolifération et l'invasion cellulaire et possède un potentiel de suppression tumorale via l'inhibition de l'autophagie dans les cellules de RCC inactives en VHL (Mikhaylova et al., 2012; Xiong et al., 2016). Ces travaux viennent supporter ceux publiés dans le laboratoire démontrant un rôle pour VHL dans l'autophagie. Le miR-155 a également un rôle dans la prolifération, l'invasion et la progression des RCCs. De façon intéressante, l'oncogène miR-23b a été associé aux RCCs où l'inhibition de miR-23b mène à l'expression de PTEN avec une diminution de Akt de la voie PI3K (L. Chen et al., 2012; W. Liu et al., 2010; Zaman et al., 2012).

Malgré ces études, il n'en demeure pas moins que de démontrer l'interaction entre un miARN et sa cible et son implication dans le développement tumoral est un travail de longue haleine. Certains miARNs sont bien caractérisés comme miR-210 ou miR-155, mais l'identification de miARNs en lien avec les ccRCCs, le gène VHL, leur dépendance à l'hypoxie demeure d'actualité. La recherche se poursuit afin de mieux caractériser ces tumeurs et déterminer plus précisément

quelles molécules sont impliquées dans le développement et la croissance des tumeurs.

1.6.7 Les miARNs comme potentiel thérapeutique

Il va sans dire que cibler le déséquilibre de miARNs dans diverses maladies pourrait mener à l'identification et au développement de nouvelles options thérapeutiques. Par contre, tout comme le développement et la commercialisation de traitements anti-cancéreux, les thérapies ciblant les miARNs (anti-miARNs et mimiques) nécessitent encore beaucoup d'études et doivent franchir plusieurs étapes avant d'obtenir l'approbation clinique. L'identification et la validation de miARNs, suivit d'études de perte et de gain de fonction *in vitro* et *in vivo* et des études pharmacologiques sont nécessaires avant de poursuivre aux études cliniques. Malgré une augmentation dans le nombre de brevets liés aux miARNs, seule une étude est actuellement en clinique (phase I) pour le traitement de cancer, soit miR-34 (MRX34) qui réduit l'expression d'oncogènes, régresse les tumeurs du foie et augmente le taux de survie des patients (Bader, 2012). Cela étant dit, il existe des études précliniques, tels que l'anti-miR-10b pour le traitement de glioblastomes qui bloque le cycle cellulaire menant à une réduction de la prolifération et une mort cellulaire (Teplyuk et al., 2016) et l'anti-miR-221 qui diminue la progression de tumeurs hépatiques et conséquemment augmente le taux de survie (Christopher et al., 2016; Park et al., 2011).

2.0 OBJECTIFS

Ces dernières années, les miARNs ont démontré leur potentiel en tant que biomarqueur pour le diagnostic et le pronostic ainsi que pour le traitement du cancer. Bien que différentes études se sont portées sur le cancer du rein, il n'existe aujourd'hui aucun biomarqueur effectif et les traitements de ccRCCs métastatiques demeurent limités et non curatifs. Étant donné que les mutations inactivant le gène VHL sont liées au développement de tumeurs rénales, cette étude a comme but d'identifier des miARNs dont la régulation est dépendante de VHL afin d'identifier des biomarqueurs potentiels et de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses rénales dont VHL est inactivé. Nos trois objectifs spécifiques sont :

- i) Identifier des miARNs dont la régulation est VHL-dépendante
- ii) Déterminer si les miARNs sélectionnées sont HIF-dépendante
- iii) Reconnaître les cibles potentielles de ces miARNs

Pour ce faire, nous avons utilisé le séquençage à haut débit afin de pouvoir établir une signature de miARNs dépendants de VHL. Des cellules de ccRCCs déficientes en VHL et dont le gène fonctionnel a été réintroduit par transfection stable ont été utilisées pour réaliser cette étude. Le niveau d'expression de miARNs a par la suite été évalué par qRT-PCR dans trois différents modèles de ccRCC déficients et positifs pour VHL. En utilisant la base de données de TCGA (The Cancer Genome Atlas), nous avons pu obtenir des données de miARNs et d'ARNm de patients atteints de ccRCC ayant une mutation sur le gène VHL afin de corroborer nos résultats in vivo. Afin de pouvoir identifier des cibles potentielles pour notre miARN d'intérêt, soit miR-2355, nous avons créé une lignée de cellules avec des niveaux réduits de miR-2355 en utilisant le système CRISPR-Cas9. Les données d'ARNm obtenues par séquençage dans nos différents modèles in vitro en plus de celles provenant de la cohorte de patients ont été utilisées afin de les corrélérer avec les cibles potentielles prédites et validées par miRWalk. Ces approches méthodologiques nous ont permis d'identifier des nouveaux miARNs régulés par VHL in vitro et chez les patients qui pourraient être importants dans la tumorigénèse des ccRCCs.

3.0 RÉSULTATS

**Identification of miR-2355 by microRNA profiling in VHL-inactivated Renal
Cell Carcinomas**

Sonia A Dastous^{1,2}, Nicolas Crapoulet², Dominique Comeau^{1,2}, Rodney J
Ouellette^{1,2}, and Sandra Turcotte^{1,2}

¹Department of chemistry and biochemistry, Université de Moncton, Moncton,
New Brunswick, Canada, E1A 3E9

²Atlantic Cancer Research Institute, Moncton, New Brunswick, Canada, E1C 8X3

Corresponding author. Sandra Turcotte email:

Sandra.turcotte@umoncton.ca

Running title: VHL-regulated microRNA in Renal Cell Carcinoma

Keywords: microRNA, von Hippel-Lindau, Renal Cell Carcinomas, Cancer, miR-
2355, hypoxia-inducible factor, next-generation sequencing

3.1 Résumé

Les carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCC) est la forme de tumeurs malignes la plus fréquente chez les cancers du rein adultes. Les microARNs (miARNs) sont souvent dérégulés dans divers types de cancers, y compris les ccRCC. Des mutations qui inactivent le gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL) sont l'un des principaux événements dans le développement des ccRCCs. Dans cette étude, nous avons cherché à identifier les miARNs régulés par VHL et leurs gènes cibles impliqués dans le développement des ccRCC. En effectuant un séquençage à haut débit dans les cellules déficientes en VHL par rapport aux cellules avec le gène fonctionnel, nous avons identifié 183 miARNs exprimés différemment. Après leur comparaison avec une cohorte de patients atteints de VHL-muté, nous avons confirmé la dérégulation de 19 et 13 miARNs surexprimés et sous-exprimés, respectivement. Nous avons choisi miR-2355, surexprimé dans 97% des patients et démontrons que son expression est dépendant de HIF-2 α , favorisant la tumorigénèse ccRCC. Nous avons ensuite utilisé le système CRISPR / Cas9 pour diminuer l'expression de miR-2355 dans les cellules 786.0 VHL-déficientes et comparé l'expression de son ARNm avec les données d'ARNm de la cohorte de patients afin d'identifier la protéine 4 contenant un domaine sushi (SUSD4) et la sous-unité régulatrice IIB de la protéine kinase A (PRKAR2B) en tant que gènes potentiels ciblés de miR-2355. Au total, cette étude identifie des nouveaux miARNs régulés par la VHL et des gènes cibles potentiels qui pourraient fournir de nouveaux outils thérapeutiques pour le ccRCC.

3.2 Abstract

Clear cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC) is the most common malignant form of neoplasm among adult kidney cancers. MicroRNAs (miRNAs) are frequently dysregulated in various types of cancer including ccRCC. Mutations that inactivate the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene is one of the major driver events in RCC carcinogenesis. In this study, we aimed to identify VHL-regulated miRNA and their target genes involved in the development of RCC. Using deep sequencing in VHL-deficient cells compared to cells with the functional gene, we found 183 differently expressed miRNAs. After comparison with a cohort of patients with VHL-mutated, we confirmed 19 upregulated and 13 downregulated miRNAs. We selected miR-2355, overexpressed in 97% of patients, and showed that this miRNA is dependent of the hypoxia inducible factor-2 α , which promotes ccRCC tumorigenesis. We then utilized the CRISPR/Cas9 editing system to decrease miR-2355 in 786.0 VHL-deficient cells and compared with mRNA data from the patient cohort and identify the Sushi Domain Containing 4 (SUSD4) and the Protein Kinase cAMP-Dependent Type II Regulatory Subunit Beta (PRKAR2B) as potential targets of miR-2355. Altogether, our study identified novel VHL-regulated miRNAs and potential target genes that could provide new therapeutic tools for ccRCC.

3.3 Introduction

Kidney cancer accounts for 3% of adult malignancies worldwide and its incidence has risen for the past two decades contributing to an increasing mortality rate (Rini et al., 2009). Clear Cell Renal Cell Carcinomas (ccRCCs) is the most common (70-80%) and lethal subtype of RCC histology (Znaor et al., 2015). For patients with early-stage ccRCCs, surgery remains one of the best therapeutic options. Unfortunately, due to the absence of symptom and effective biomarkers, 30% of patients will present themselves with advanced-stage and metastatic tumors at the time of diagnosis and additional 30-40% of patients with localized tumors will have a metastatic relapse (Chin et al., 2006; Lam et al., 2005; Motzer et al., 1996). The overall 5-year survival rate for advanced stage ccRCC is roughly 10% (Allory, Culine, & de la Taille, 2011). Despite the progress in genetic alterations driving ccRCC development, these tumors remain under-characterized resulting in a lack of long-term effective therapies (Greef & Eisen, 2016). A better understanding of ccRCC pathogenesis is crucial to improve ccRCC detection and treatment.

Tumor heterogeneity in ccRCC is particularly challenging due to the variability in mutational signatures that occur during their progression (Gerlinger et al., 2014). However, most ccRCC (85%) involve mutations or epigenetic silencing in the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene (Herman et al., 1994; Kondo & Kaelin, 2001). We have previously demonstrated that targeting the loss of VHL could be a promising therapeutic option (Chan et al., 2011; Sutphin et al., 2007; Turcotte et al., 2008). The coded protein, pVHL, is a critical component of the E3 ubiquitin ligase complex composed of cullin-2 that interacts with VHL, elongin C, elongin B (VBC-Cul2) and Rbx at its C-terminus (Iwai et al., 1999). This complex is involved in the degradation of diverse targets, such as Hypoxia-Inducible Factors (HIF). Briefly, the HIF- α subunits are hydroxylated on specific proline residues (Pro-402 and Pro-564 in HIF-1 α and Pro-405 and pro-531 in HIF-2 α) by prolyl hydroxylases (PHDs) under normoxic conditions (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). This modification allows recognition of HIF by the VBC-

Cul2 complex for its polyubiquitination and proteosomal degradation (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001; Kaelin, 2002). Conversely, this interaction does not occur under hypoxic conditions since PHDs activity is inhibited, resulting in stabilization of HIF- α . Furthermore, mutations in VHL gene observed in VHL disease and RCCs disrupt HIF- α ubiquitination leading to its constitutive expression, translocation to the nucleus and dimerization with the stable β subunit (HIF-1 β), forming a heterodimeric transcription factor capable of binding to Hypoxia Response Element (HRE) sequence. While HIF-1 α and HIF-2 α share some functions, HIF-1 α seems to be responsible of the regulation of genes involved in the glycolytic pathways (GLUT1, GLUT3, PDK1, CAIX, PGK) while HIF-2 α favors angiogenesis and tumor growth promotion (VEGF, Cyclin D, TGF- α) (Hu et al., 2003; Raval et al., 2005). Interestingly, studies have demonstrated that HIF-2 α is the primary oncogenic driver in ccRCC while HIF-1 α overexpression results in reduced tumour growth (Raval et al., 2005). Consequently, suppression of HIF-2 α in xenograph models has been showed to be sufficient for inhibition of ccRCC development (Kondo et al., 2003; Raval et al., 2005).

MicroRNAs (miR, miRNA) are double stranded small non-coding RNAs of 19-23 nucleotides-long known to regulate gene expression at a post-transcriptional level (Carmell & Hannon, 2004). miRNAs have developmental stage- as well as tissue-specific expression and their deregulation has been studied in various diseases including cancer. Microarrays and deep sequencing identified several downregulated miRNAs in patients with ccRCC compared to normal kidney tissue such as miR-200c, -141, -363, -429 and -514. Besides, miR-16, miR-21, -27, -34a, -155, -210, -224, and -452 were found to be upregulated (Jung et al., 2009; Osanto et al., 2012; Tang & Xu, 2015). While ccRCC miRNA profiling analysis have been previously studied for diagnostic or prognostic purposes, still few take into consideration the status of VHL (J. Chen et al., 2013; Gowrishankar et al., 2014; Neal et al., 2010; Slaby et al., 2012; White et al., 2011). In this study,

we used next-generation sequencing to identify novel VHL-regulated miRNAs in ccRCC and their molecular targets. By combining *in vitro*, *in silico* and clinical data, we report 32 clinically relevant VHL-regulated miRNAs in ccRCC. We focused on novel miRNA-2355 and regulated pathways providing new insights into the mechanisms and pathways underlying RCC oncogenesis.

3.4 Results

3.4.1 Deep sequencing to identify VHL-regulated miRNAs in ccRCC

To better understand the effects of VHL inactivation on miRNA expression, we used next-generation sequencing to generate a miRNA signature profile comparing VHL-deficient cells (RCC4 VHL -/-) against their isogenic counterparts with a functional VHL gene (RCC4 VHL +/+). We found a total of 183 miRNAs that show significant differential expression based on VHL gene status ($p < 0.05$) (Figure 3.1A). From this list, we identified 87 miRNAs that were upregulated while 96 miRNAs were downregulated in the absence of VHL. Although, some of them have been reported such as miR-210 and miR-155, our results identified novel miRNAs that are deregulated in ccRCC based on VHL mutational status. To further verify the reliability of the deep sequencing analysis, the expression of 22 miRNAs was quantified by qRT-PCR using Taqman probes. Our results confirmed that most of the selected miRNAs were significantly up or down-regulated in RCC4 VHL +/+ cells (Figure 3.1B, 3.1C). Additionally, we evaluated the expression level of these 22 miRNAs in two other VHL-/- cell lines, RCC10 and 786.0, compared to their isogenic matched counterparts with wild-type VHL. Our analysis demonstrated that miR-210, -155, -495 and -2355 expression was significantly decreased in all three experimental VHL-/- cell lines compared to VHL+/+ cells while the expression of miR-340, -197, -138, -203, -154, -381, -363, -1271 and -152 decreased in at least two VHL-/- cell lines. These results established a signature profile of miRNAs that show differential expression based on the VHL status in ccRCC.

3.4.2 Identification of clinically relevant VHL-regulated miRNAs by TCGA

In order to correlate our *in vitro* findings with clinical data, we used the cBioPortal database (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013) to identify a cohort of 34 patients with ccRCC included in The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<http://cancergenome.nih.gov/>) (Table 1). The criteria of selection were patients that i) harbor VHL mutations and ii) have miRNA expression data from the tumor

sample and patient-matched normal adjacent tissue. As seen in the general population, there are more men than women in this cohort with a mean of 62 years of age. Tumor grades vary from G2 to G4, cover all stages and include patients with or without lymph node or distant metastasis. A total of 35 VHL mutations have been identified by sequencing (13 missense, 8 FS deletion, 6 FS insertion, 5 nonsense, 1 splice and 1 nonstop) dispersed on all 3 exons with none of them before the codon 54. (Table 2, Figure 3.2A). In this patient population, 252 other mutations were identified with PBRM1, MUC4, SETD2 and BAP1 being the most frequent mutated genes, as reported by others using TCGA (Figure 3.2B). The comparison between normalized miRNA expression in ccRCC and patient-matched normal tissue identified a total of 246 significantly ($p < 0.05$) deregulated miRNAs in a minimum of 50% of patients (Figure 3.2C). Among them, 32 miRNAs were correspondingly observed in our RCC4 miRNA profile (upregulated or downregulated) (Table 3). The expression of 8 miRNAs previously quantified in three ccRCC models with or without VHL was also observed in the cohort of patients as shown by boxplot, demonstrating an increase of miR-210, miR-155, miR-2355, miR-576, miR-340, miR-1271, miR-130b and miR-197 in tumors versus normal patient samples (Figure 3.2D). Taken together, these results distinguished 32 VHL-regulated miRNAs based on *in vitro* profiling that show clinical relevance in ccRCC patient samples.

3.4.3 pVHL regulates miR-210, -155, -2355 and -197 in a HIF-dependent manner.

Because of the important role for VHL in the regulation of the HIF- α subunit and hypoxic related pathways, we investigated whether the upregulation of miRNAs in VHL-inactivated cells was occurring through a HIF-dependent mechanism. We selected miR-155-3p, miR-2355-5p, miR-1271-5p and miR-197-3p that were significantly overexpressed in at least two VHL-/- cell lines as well as in 50% of our patient population. To study this question, RCC4 VHL -/- cells naturally expressing high levels of HIF-1 α and HIF-2 α were stably transfected with shRNAs against HIF-1 α or HIF-2 α (RCC4 shHIF-1 α or RCC4 shHIF-2 α). Knockdown

expression of HIF- α subunits was validated by western blot analysis (Figure 3.3A) while HIF- α targets were quantified by qRT-PCR (Figure 3.3B, 3.3C). As expected, a decrease of HIF-1 α protein expression and HIF-1 α targets BNIP3 and PDK1 mRNA levels were observed in RCC4 shHIF-1 α without variation in RCC4 shHIF-2 α . Similarly, knockdown of HIF-2 α protein expression in RCC4 shHIF-2 α cell lines was observed with a significant decrease in VEGFA levels (HIF-2 α target) and negligible variations in RCC4 shHIF-1 α . Afterwards, miRNAs quantification demonstrated decreased levels of miR-1271-5p and miR-155-5p expression in both RCC4 shHIF-1 α and RCC4 shHIF-2 α cell lines (Figure 3.3D). In contrast, miR-2355-5p and miR-197 were unaffected by the loss of HIF-1 α , but expression was decreased in RCC4 shHIF-2 α to the same levels as observed in RCC4 VHL +/+ cell lines. These results suggest that miR-1271 and miR-155 are HIF-1 α and HIF-2 α regulated whereas miR-2355 and miR-197 are only regulated by HIF-2 α . To further confirm possible regulation of miR-2355-5p and miR-197-3p by HIF-2 α , VHL-/- 786.0 cells expressing only high levels of HIF-2 α and no HIF-1 α were used to generate 786.0 shHIF-2 α cell line. As anticipated, the level of VEGFA decreased in 786.0 shHIF-2 α cells at a similar level than the one observed in 786.0 VHL+/+ cells when compared to parental 786.0 cells (Figure 3.3E). MiRNA quantification demonstrated once more decreased levels of miR-2355 and miR-197 in HIF-2 α knockdown models (Figure 3.3F). Since HIF-2 α has been shown to promote ccRCC tumor development, these results suggest that miR-2355-5p and miR-197-3p could be involved in ccRCC tumorigenesis. Then, we further narrowed our selection to miR-2355, which is upregulated in VHL-/- cells and in the TCGA database with a fold change of 2.14 and 3.09, respectively, and overexpressed in 97.06% of patients. By investigating the cohort data, we found that miR-2355 expression significantly decrease with disease progression and metastasizes from G2 to G4 (Figure 3.3G). To further demonstrate that miR-2355 is regulated by the presence of VHL, we silenced VHL in the 786.0 VHL+/+ cells using the CRISPR/Cas9 system. Validation by western blot analysis showed a decrease in VHL expression in both CRISPR A and CRISPR B constructs (Figure 3.3H). Elegantly, our results showed that the level of miR-2355 significantly

increased with the knockdown of VHL as observed with miR-210 (Figure 3.3I). These results demonstrate that the upregulation of miR-2355 originates from VHL-inactivation and the deregulation of HIF-2 α in ccRCC.

3.4.4 Signaling pathways affected by VHL inactivation in 786.0 cells and ccRCC patients

Considering that HIF-2 α , but not HIF-1 α , has been shown to contribute to RCC tumor growth, our studies were further pursued in the HIF-2 α expression cell line, 786.0. To identify signaling pathways and genes differently expressed in response to VHL expression, we first performed next-generation sequencing in 786.0 VHL -/- and 786.0 VHL +/+ cells and identified 1948 genes deregulated in the absence of VHL (Figure 3.4A). About 1221 and 727 genes were upregulated and downregulated, respectively, including GLUT1 (SLC2A1), Adipose differentiation-related protein (ADRP) and Cyclin D1 (CCND1), which are known to be upregulated in VHL-/- cells (Hu et al., 2003) (Figure 3.4B). Although VEGF-A did not meet our cut off criteria during the deep sequencing analysis, its expression was significantly higher when individually measured in 786.0 VHL -/- cells (fold change of 3.19). We next looked at the available mRNA sequencing data (N=32) of our TCGA patient cohort to identify clinically relevant VHL-regulated genes. Our analysis found 7374 significantly deregulated mRNAs ($p < 0.05$) in a minimum of 50% of patient tumour samples, 3401 up- and 3973 downregulated. As expected, GLUT1, ADRP, CCND1 and VEGF-A expression was significantly higher in tumor samples when compared to normal adjacent tissue (Figure 3.4C). By comparing our *in vitro* data to the analyzed clinical data, we determined 607 genes that were significantly deregulated in ccRCC resulting from VHL inactivation (Figure 3.4A, 3.4D). Then, we used DAVID 6.8 database to perform a KEGG Pathway analysis of the 607 genes and identified 12 significantly relevant VHL-regulated pathways ($p < 0.05$) including metabolism, cell cycle, DNA replication and mismatch repair (Table 4). Taken together, these

results demonstrate the effects of VHL inactivation on various pathways and its contribution to ccRCC carcinogenesis.

3.4.5 Knockout of miR-2355 by the CRISPR-Cas9 system and deep sequencing to identify miR-2355-5p regulated genes

To gain further insight into miR-2355 regulated genes and pathways, we created a miR-2355 knockout cell line (786.0 VHL^{-/-} CRISPR 2355) using the CRISPR-Cas9 technique (Figure 3.5A). As expected, amplification of the 1kb genomic region surrounding miR-2355-5p CRISPR target site was cleaved in two fragments (600bp and 400bp) by the T7 endonuclease confirming CRISPR KO (Figure 3.5B). Decrease in both miR-2355-5p and -3p expression was observed while the level of other miRNAs remained stable (Figure 3.5C). These results demonstrate the efficiency of our CRISPR/Cas9 approach to target miR-2355. To investigate the functional role of miR-2355 and identify potential targets, we performed next-generation sequencing in 786.0 CRISPR miR-2355 KO cells compared to 786.0 VHL^{-/-} cells. Following analysis, we found 519 deregulated genes at the transcriptional level. By comparing this list with the 7374 genes previously identified in the TCGA patient cohort, we end up with 80 genes potentially regulated by miR-2355 (Figure 3.5D, 3.5E). Taken together, these results suggest that miR-2355 could actively regulate, either directly or indirectly, various gene expression in ccRCCs.

3.4.6 MirWalk prediction combined with data analyses to identify miR-2355-5p targeted genes

To take into consideration the VHL status of the 786.0 cells, we added the 607 VHL-regulated genes identified by our mRNA analysis presented in Figure 3.4B into the analysis. Thus, we compared the genes differently expressed between the 786.0 cells with or without VHL and the 80 miR-2355-regulated genes identified in our last analysis between TCGA patient cohort and the 786.0 cells with CRISPR

miR-2355 (Figure 3.6A). A total of 6 up- (PTGDR, UPK3A, KIR3DL2, EBF2, UBASH3A and KCNT1) and 4 downregulated genes (MTNR1A, SUSD4, AFP, and PRKAR2B) were identified. Pearson's Correlation Coefficient of mRNA and miRNA data demonstrate the degree of correlation between miR-2355 expression and these genes (Figure 3.6B). Our last step was to distinguish genes that could be the result of a direct interaction between miR-2355 and its mRNA target. The miRwalk 2.0 prediction database (Dweep & Gretz, 2015; Dweep, Sticht, Pandey, & Gretz, 2011) was used and generated an overwhelming list of 11839 genes hosting a potential miR-2355-5p binding sites in their mRNA (Figure 3.6C). To further narrow down this list, we compared these predictions to both previous analyses and found 5 upregulated (PTGDR, KIR3DL2, EBF2, UBASH3A and KCNT1) and 2 downregulated (PRKAR2B and SUSD4) genes (Table 5, Table 6). Interestingly, patient samples data demonstrates that an increase in miR-2355 expression is often associated with a decrease in predicted targets PRKAR2B and SUSD4 (Figure 3.6D). Taken together, our results demonstrate that miR-2355 is overexpressed in VHL-inactivated tumors (*in vitro* and in TCGA clinical samples) and have identified PTGDR, KIR3DL2, EBF2, UBASH3A, KCNT1, PRKAR2B and SUSD4 as potential direct targets of miRNA-mRNA interaction resulting in the deregulation of various genes and pathways contributing to ccRCC development.

3.5 Discussion

Despite recent advances in cancer therapy and diagnosis, there are no effective biomarkers to detect ccRCCs at early stages and metastatic RCC remain resistant to treatments. Thus, searching for alternative diagnostic and prognostic tools in RCC as well as novel treatment options is of the greatest importance. Abnormally expressed miRNAs have been shown to contribute to ccRCC initiation, development as well as migration and invasion (Cai, Li, & Zhang, 2016; Gao et al., 2016; Lu et al., 2015; Wang, Li, Cui, Feng, & Fan, 2016; Xing & He, 2016). Although few studies reported VHL-regulated miRNAs, profiling signature in RCCs based on VHL mutational status is still limited. This study aimed i) to identify miRNAs that are differently expressed in VHL-inactivated cells and tumors and ii) to determine potential targets for selected miR-2355. First, we identified 183 miRNAs with significant differential expression between VHL-inactivated cells compared to the VHL gene reintroduced cells (Fig. 1A). In addition to some miRNAs reported in the literature such as miR-210, -155, -30, and -106, our study identified several novel VHL-regulated miRNAs. We used three different RCC models with VHL inactivation to validate selected miRNAs. While we were able to validate all miRNAs in the RCC4 cell line, only 4 (miR-210, miR-155, miR-495 and miR-2355) were deregulated in all cell lines and 13 in at least two cell lines (Fig. 1B, C). These results demonstrated the heterogeneity between RCC. Variations can also be attributed to cell lines manipulation and immortalization.

To constrain this element, we corroborated our signature profile with clinical samples from the TCGA database to find the most clinically representative deregulated miRNA and improve our understanding of ccRCC development. We selected patients harboring a VHL mutation for which miRNA expression from the tumor and the normal adjacent tissue were available (Table 1 and Fig. 2). To our knowledge, among the 32 clinically relevant miRNAs that met our stringent criteria, only miR-210, -100, -30c, -200a, -155, -340, -576, -130b, -455, -19a, -

1271, -138, -139, -27b and -10a have been previously reported in RCC literature (Table 3) (Gao et al., 2016; Gu et al., 2015; Liang et al., 2013; Ma et al., 2016; Mathew et al., 2014; Osanto et al., 2012; Redova et al., 2013; Wotschofsky et al., 2012; Wu et al., 2012). Interestingly, miR-155 and miR-210 have been shown to significantly correlate with ccRCC tumour size (Neal et al., 2010) whereas miR-100 overexpression correlates with unfavorable prognosis (Wang et al., 2013). Although miR-204 did not meet all of our criteria, we were able to quantify differential expression using Taqman probe (data not shown). MiR-204 has been recently identified as a VHL-regulated miRNA with the potential to suppress tumour growth via LC3B-mediated autophagy demonstrating the potential for miRNAs in the future of ccRCC treatments, prognosis and diagnosis (Mikhaylova et al., 2012).

Given the major role of VHL in the regulation of HIF- α , we selected miR-2355, -1271 and -197 to study their HIF-dependency using VHL^{-/-} cells stably expressing HIF-1 α or HIF-2 α shRNA with miR-155 serving as a control (Fig. 3). We found that miR-1271 was HIF-1 α and HIF-2 α dependant whereas miR-2355 and miR-197 solely depend on HIF-2 α expression. This was very exciting considering studies have demonstrated the therapeutic potential of HIF-2 α suppression in RCC (Fan et al., 2016; Raval et al., 2005). MiR-1271 has been shown to increase cell proliferation and invasion in non-small-cell lung carcinoma, and is overexpressed in head and neck cancer. It was also reported to be downregulated in gastric, pancreatic and ovarian cancer. MiR-197 has been found dysregulated in a variety of cancers and upregulated in lung and pancreatic cancers (Hamada et al., 2013; Mavridis et al., 2015) and is associated with drug resistance in ovarian cancer (Liu et al., 2015). Finally, there is only one publication on miR-2355, which reports its downregulation in breast cancer cells with increased invasive and migrative capabilities. They also observed a decrease of miR-2355 expression in serum of breast cancer patients following treatment with antiangiogenic drugs bevacizumab and rh-endostatin (Wei, Cuicui, Jing, & Kai,

2015). Interestingly, miR-2355 fold change seems to decrease as grade increases in our cohort suggesting it might be an important molecule for initiation and low grade tumor development. Given its novelty and taking into consideration our acquired data, we selected miR-2355 for further analysis and its VHL-regulation was once more confirmed in our 786.0/VHL +/+ CRISPR VHL KO model.

We next chose the 786.0 VHL -/- cell line only expressing high levels of HIF-2 α to further study miR-2355 related pathways. By comparing the list of VHL-regulated genes from our NGS mRNA analysis with the selected cohort from TCGA (Fig. 4) and performing KEGG Pathways analysis, we emphasises the metabolic importance in ccRCC, with deregulations observed in the pentose phosphate pathway (PPP), the biosynthesis of amino acids, glycolysis/gluconeogenesis, fructose and mannose metabolism (Table 4), supporting currently published ccRCC data (Zaravinos et al., 2014). Cell cycle and DNA repair were also among the signaling pathways affected by the VHL status.

We were interested to further study the role of miR-2355 in ccRCC and developed a knockdown cell line for this miRNA using the CRISPR/Cas9 system and performed mRNA profiling by NGS (Fig. 5). We used the 786.0 cell line and found 80 genes that were significantly differently expressed between the parental and the miR-2355 knockdown cells. When we interrogated the miRwalk database to find validated and predicted miR-2355 targets, we found 7 dysregulated genes (Fig. 6). Five genes were upregulated (PTGDR, KIR3L2, EGF2, UBASH3A, KCNT1) and probably indirect targets or consequence of this overexpressed miRNA. On the other hand, PRKAR2B and SUSD4 are two downregulated gene that could be direct targets of miR-2355. The Sushi Domain-Containing Protein 4 (SUSD4) functions as a complement inhibitor. This protein is expressed in two isoforms (SUSD4a and SUSD4b) and present in several human tissues. Only one scientific paper studied the expression of SUSD4 in cancer and showed that

SUSD4 is expressed in epithelial breast tumor cells and can affect migration and invasion (Englund et al., 2015). They also observed that expression of SUSD4 was associated with a better prognosis for breast cancer patients. No study report expression of SUSD4 in RCC. It could be very interesting to study the consequence of lower SUSD4 expression level observed in VHL-inactivated tumors cells associated with higher level of miR-2355 in future studies. Besides, the major intracellular signalling event induced by cAMP is the activation of the protein kinase A (PKA). In mammals, PKA is composed of two catalytic (C) and two regulatory (R) subunits. The protein kinase A regulatory subunit 2B (PRKAR2B) has been studied in different cancer types excluding RCC. A paper recently published indicated that PRKAR2B is overexpressed in metastasis compared to primary site in prostate cancer (Sha et al., 2017). This same study showed that PRKAR2B affects cell invasion by modulating cell cycle genes expression. Others, demonstrated that inhibition of PRKAR2B decrease TNF- α action on HIF-1 α stability (Schoolmeesters, Brown, & Fedorov, 2012). PRKAR2B has also been shown to play a role in growth regulation of neuroblastoma cells, cholangiocarcinoma and malignant thyroid tissue (Ferrero et al., 2015; Kim et al., 1997; Loilome et al., 2011)

In summary, our study identified a 32 miRNAs signature including novel VHL-regulated miRNAs that could be important in ccRCC. Among them, we showed that miR-2355 is overexpressed in 97% of patients with VHL-mutated tumors, decreases with disease progression and is acting through an HIF-2 α dependent manner. Considering the role of HIF-2 α in ccRCC, we further pursued our study and used different molecular approaches combined with next generation sequencing and database analyses to identify SUSD4 and PRKAR2B as potential target for miR-2355. Further inquiries will be necessary to fully understand the role of miR-2355 in the development of ccRCC that could lead to either a potential therapeutic target or novel biomarker for the diagnosis or prognosis of ccRCC.

3.6 Materials and methods

3.6.1 Cell culture

The human ccRCC cell lines (RCC4, RCC10 and 786.0) and their isogenic counterparts stably expressing VHL (RCC4-VHL, RCC10-VHL and 786.0-VHL) were kindly provided by Amato J. Giaccia (Stanford University, CA, USA). The 293T cell line was provided by Anne-Marie Mes-Masson (Montreal Cancer Institute, QC, Canada). All cell lines were tested for mycoplasma and authentication was performed by short tandem repeat (STR) DNA profile at Genetica DNA Laboratories (Burlington, NC, USA). Cells were maintained in DMEM/high glucose medium (GE Healthcare Life Science, UT, USA), supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS) (Wisent Bio Science, QC, Canada), 2mM L-glutamine and 1mM sodium pyruvate (GE Health Life Sciences, ON, Canada) and cultured at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. The cells were passed every 3-4 days using trypsin-EDTA.

3.6.2 Stable transfection for HIF-2 α knockdown

RCC4 and 786.0 shHIF-1 α and shHIF-2 α were generated using the Human pLKO.1 lentiviral shRNA target gene set (RHS5433) from Open Biosystem. Briefly, lentivirus were produced by co-transfection of the plasmid sequence and the lentiviral packaging mix in the 293T cells. Cells were transduced with lentiviral particle expressing shRNA constructs for HIF-1 α (TRCN0000003808 and 3810) and HIF-2 α (TRCN0000003804 and 3807) in presence of 6 μ g/mL polybrene. Puromycin (1 μ g/mL) was used for selection. Knockdown was tested by western blot analysis while HIF-target genes were quantified by qRT-PCR.

3.6.3 microRNA profiling by Next-Generation Sequencing

Small RNA was isolated using the miRVana isolation kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. RNA library construction

and sequencing were conducted with Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) protocols. Small RNAs were loaded on an Ion PI Chip v2 and sequenced with an Ion Proton Sequencer using the 260 flows parameter. Small RNA libraries were constructed from three biological replicates for each condition. Initial FASTQ files were gathered and adaptor sequences were trimmed. Sequencing data filtered by eliminating reads of < 16 and of > 60 nucleotides. Reads with bases showing Q scores of < 20 were eliminated. Data was normalized using the Quartile and TMM method.

3.6.4 mRNA sequencing using Ion Torent

Total RNA was first quantified using the Qubit® RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) and RNA quality was assessed using the TapeStation 2200 with High Sensitivity RNA ScreenTape (Agilent, ON, Canada). Poly(A) mRNA was isolated from 20-50 µg of total RNA using the Dynabeads® mRNA DIRECT Micro Kit™ (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturers protocol. These mRNA samples were analyzed for quality and purity using High Sensitivity RNA ScreenTape on TapeStation 2200 and quantified with the Qubit® RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). 20 ng of each mRNA sample were partially digested for 3 min with RNase III (to reduce RNA fragment size) prior being used for the synthesis of cDNA libraries using the Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Fisher Scientific). Quality and integrity of the final libraries were confirmed using the TapeStation 2200 with High Sensitivity D1000 ScreenTape. Final library cDNA concentrations were determined by qPCR with PerfeCTa® NGS Quantification Kit (Quanta Biosciences, MA, USA) according to the manufacturer protocol. Prior to sequencing, two barcoded libraries were diluted to 7 pM and pooled before performing emulsion PCR on OneTouch 2 system using the Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit (Thermo Fisher Scientific). Ion spheres particles produced were then purified and loaded on Ion PI™ Chip v3 (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific) in order to be sequenced on Proton Sequencer with Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit and 560 flows. At least 21 million reads

were sequenced from each library and each condition was analysed in duplicate. Bam files obtained were trimmed using cutadapt software in order to remove adapter sequences and bases with a quality score under Q20. Reads shorter than 17bp or higher than 300bp were removed before alignment. Two pass alignment was performed with TopHat then Bowtie2 softwares using the human genome reference (HG19). Resulting aligned reads were merged using Picard tools v1.80 and analyzed with Strand NGS software (formerly Avadis NGS).

3.6.5 Identification of VHL mutated ccRCC patients in cBioPortal

The online cBioPortal Cancer Genomics Tool was used to characterize the VHL status of ccRCC patients from The Cancer Genome Atlas (TCGA-Nature 2013), (Table 2). Once the VHL-mutated ccRCC patients were identified, miRNA and mRNA TCGA datasets (Illumina GA or Hiseq Level 3) and corresponding clinical data (Table 1) were obtained from the TCGA data portal. Only patients with miRNA data from ccRCC and matching adjacent tissue were used for this analysis.

3.6.6 TCGA miRNA and mRNA data analysis

Fold changes were calculated by comparing normalized reads per million miRNA/mRNA mapped (RPM) between tumor and normal sample obtained from the same patients. All Zeros were replaced with the lowest RPM quantified. All used data is publically available and open-access. Only patients that met the following criteria were used in our analysis: (1) patients with VHL-mutated ccRCC and (2) available tumor and patient-matching normal tissue miR expression data. MiRNAs and mRNA were considered clinically relevant by applying the following criteria (1) paired two-tailed student t-test value $p < 0.05$, (2) median fold change of < 0.667 or > 1.5 in 50% of patients and (3) up- or downregulation of miRNA in miRNA or mRNA profiling. Significance between

miR-2355 expression and tumor grade was assessed using a generalized linear model (GLM) in RStudio where $*p < 0.05$.

3.6.7 RNA isolation and Quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from cell lines using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. RNA was quantified using the Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) and its purity was assessed by the ratio absorbance 260/280. RNAs (5 μ g) were subjected to reverse transcription using SUPERScript II transcriptase (Invitrogen, CA, USA). The resulting cDNA was used for real-time qPCR (Realplex², Eppendorf) for quantification by SYBR green (Quanta Biosciences). RNA expression was normalized to RPLPO expression. mRNA relative expression was calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method. All primers sequences were provided by PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>).

3.6.8 miRNA isolation and TaqMan qRT-PCR

MiRNAs were isolated using the miRPremier microRNA isolation kit (Sigma-Aldrich, ON, Canada) following the manufacturers protocol. Briefly, $\leq 5 \times 10^6$ cells were lysed in the provided lysis solution + 10% β -mercaptoethanol, and centrifuged at 16,000 x g for 5 min. A volume of 1.5x ethanol 100% was added to the supernatant. The mixture was then passed through the column, washed and eluted in nuclease-free water. The miRNAs were quantified using the Nanodrop ND-1000 and its purity was assessed by the ratio of absorbance 260/280. Isolated miRNA samples (10-100 ng) were converted to cDNA using the TaqMan microRNA reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, CA, USA) for the selected miRNAs. miRNA quantification was performed by PCR using the TaqMan Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystem) on the Mastercycle Realplex² (VWR, ON, Canada). The specificity of amplification was

monitored by the dissociation curve of the amplified product. Fold changes were calculated after normalizing the data to RNU44 by the $\Delta\Delta C_t$ method. The selected miRs and assay ID were as follows : miR-1301 (002827), miR-224 (121210), miR-213 (00516), miR-34a (000426), miR-99a (00435), miR-130b (000456), miR-340 (002258), miR-576 (002351), miR-197 (000497), miR-138 (002284), miR-2355 (241374), miR-155 (002287), miR-203 (000507), miR-154 (000478), miR-495 (001663), miR-381 (000571), miR-210 (000512), miR-218 (000521), miR-363 (001271), miR-1271 (002779), miR-152 (000475) and miR-9 (000583)

3.6.9 Western blot assay

Total proteins were extracted using M-PER lysis buffer (50mM Tris (HCl) pH 7.5, 200mM NaCl, 0.25% Triton X-100, 10% Glycerol) containing 1X Protease and phosphatase inhibitor cocktails. Cell lysates were centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C and quantified by BCA protein assay kit (Thermo Fisher scientific) using the SpectraMax Plus 384 microplate reader. Proteins (30µg) were separated on 10-15% SDS/PAGE gel and transferred onto a 0.45 micron PVDF transfer membrane (Immobilon-P, Millipore, IE). Membranes were blocked using 5% skim milk diluted in a solution of 0.075% PBS-Tween (PBS-T) and incubated overnight in 3% BSA with specific primary antibodies (HIF-1 α 1:500 (BD Biosciences, ON, Canada), HIF-2 α 1:500 (Novus Biologicals, ON, Canada), VHL 1:200 and β -actin 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)). Immunoblots were washed and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies diluted in 5% skim milk PBS-T (Jackson Immunoresearch Laboratories, PA, USA) and visualized using the Amersham ECL Primer Western Blotting Detection reagent, (GE Healthcare Life Sciences, ON, Canada) on a Chemidoc MP Imager (BIO-RAD, ON, Canada).

3.6.10 CRISPR Knockout

Specific primers were designed using MIT CRISPR Designer (<http://crispr.mit.edu/>), phosphorylated and annealed using T4 ligase buffer (NEB, ON, Canada). The annealed product was ligated into BsmBI (NEB, ON, Canada) digested lentiCRISPRv2 plasmid, a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #52961) and amplified using quick ligase (NEB, ON, Canada). Lentivirus were produced by co-transfection of the sequenced plasmid and the lentiviral particle containing LP1, LP2 and pVSV-G vectors in the 293T cells. Cells were transduced with lentiviral particle expressing plasmids by spinfection for 2 hr at 37°C in presence of polybrene to aid transduction. Puromycin (1 µg/mL) was used for selection. Knockdown of miR-2355 and VHL were validated by qPCR and western blot analysis, respectively.

3.6.11 T7 endonuclease assay

Genomic DNA was extracted using the PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen, CA) and subjugated to T7 endonuclease assay using the EnGen mutation detection kit (NEB, ON, Canada). Briefly, amplification of 1000bp region with an off centered CRISPR target using specific primers and Q5 hot-start HF enzyme was performed. The T_m of specific primers was calculated using NEB T_m calculator. Resulting cDNA was analysed on 0.4% agarose gel (1X SYBR Safe DNA gel stain) to verify amplification. Once confirmed, the product was denatured and annealed followed by T7 endonuclease digestion for 30 or 60 min. Reaction was stopped by proteinase K addition. Resulting digestion was run on a 2% agarose gel (1X SYBR Safe DNA gel stain) and visualised on a Chemidoc MP Imager (BIO-RAD, ON, Canada).

3.6.11 Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). All experiments were performed at least three times, and all samples were analyzed in triplicates. Paired student t-tests were used to determine the statistical significance where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ unless otherwise specified.

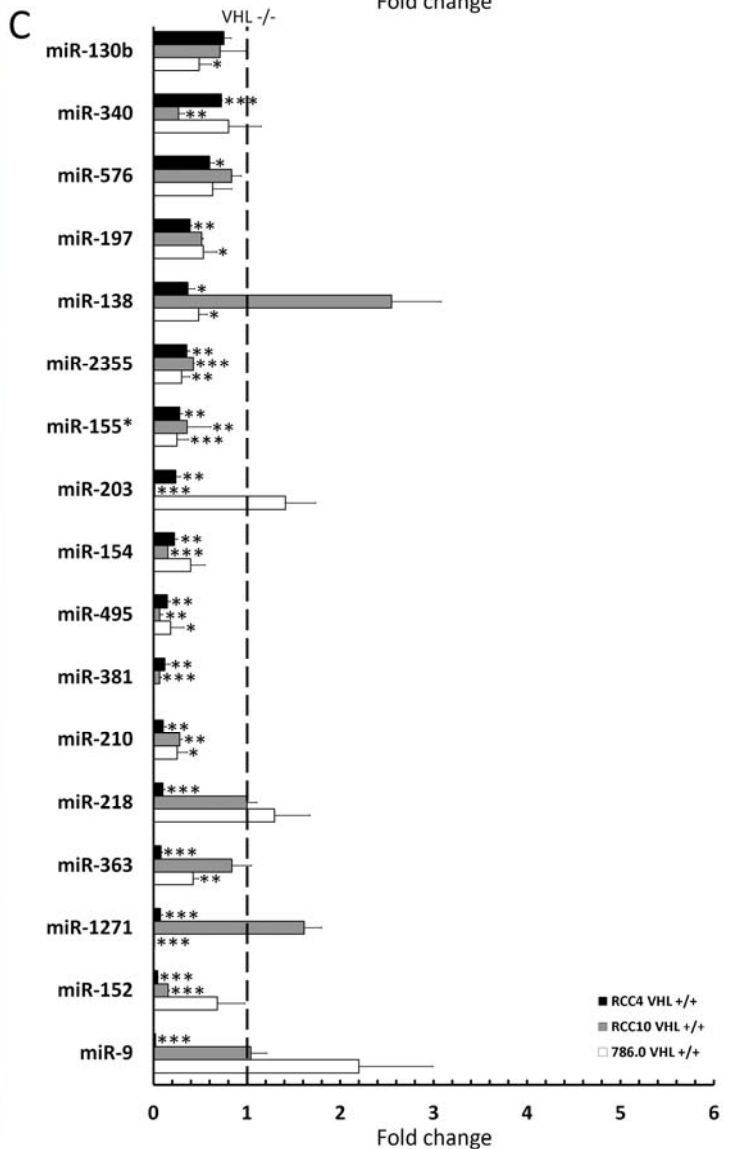
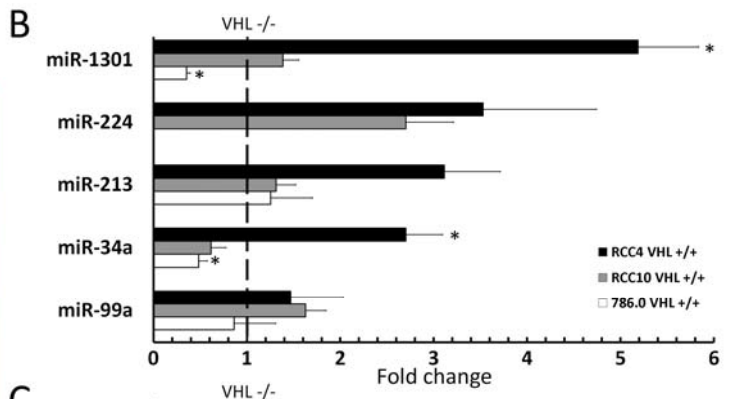


Figure 3.1. miRNAs profiling in RCC4 and RCC4/VHL cells by Next-Generation Sequencing.

A. Heatmap showing mature miRNAs that are significantly up- or downregulated in RCC4 cells according to the VHL status. miRNAs from RCC4 VHL^{-/-} and RCC4 VHL^{+/+} cells were extracted using mirVana kit. Deep sequencing was performed in three biological replicates on Ion Torrent platform, analyzed and normalized with the TMM and the quartile methods. The criteria for selection was based on miRNAs that had a significant differential expression ($p < 0.05$), with a fold change of < 0.67 or > 1.5 , a minimum of 1 reads in both cell lines and at least one cell line with 5 reads. Data is represented as Log₂ fold change. **B.** Validation of upregulated and **(C)** Downregulated miRNAs expression by Taqman qRT-PCR in RCC4, RCC10 and 786.0 VHL-deficient cells (VHL^{-/-}) versus their VHL positive counterparts (VHL^{+/+}). Relative expression of miRNAs was normalised to RNU44 expression and fold change was compared to VHL^{-/-} (dotted line). Mean and SEM were calculated from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed between the fold change from VHL^{+/+} to VHL^{-/-} cells using Student's T test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

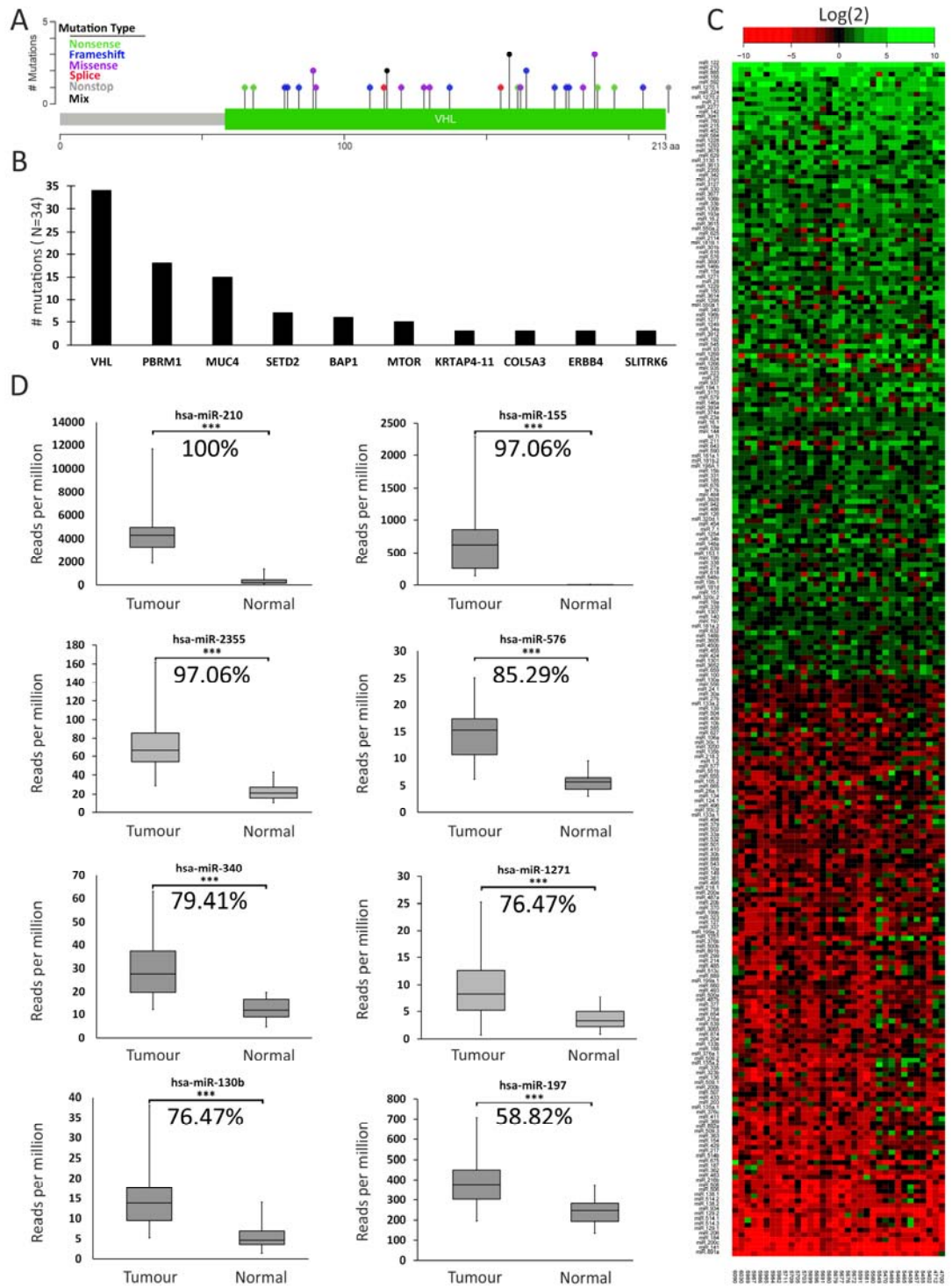


Figure 3.2. Identification and validation of clinically relevant miRNAs.

A. Information on VHL mutation type, location and frequency in a cohort patients (N=34) with VHL-mutated ccRCC from The Cancer Genome Atlas (TCGA) **B.** Representation of top mutated genes in this cohort. **C.** A total of 246 differently expressed miRNAs were identified in VHL mutated ccRCC versus adjacent normal tissue. The criteria for selection was based on miRNAs that had a significant differential expression ($p < 0.05$) with a fold change of < 0.67 or > 1.5 in at least 50% of patients. Data are represented as Log₂ fold change. **D.** Boxplot of selected miRNAs that show an increase expression in ccRCC tumors versus patient-matched normal tissue (N=34). Quantification is represented by the number of reads per million between normal and tumor patient sample. Statistical analyses were calculated using Student T-test between normal and tumor sample (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

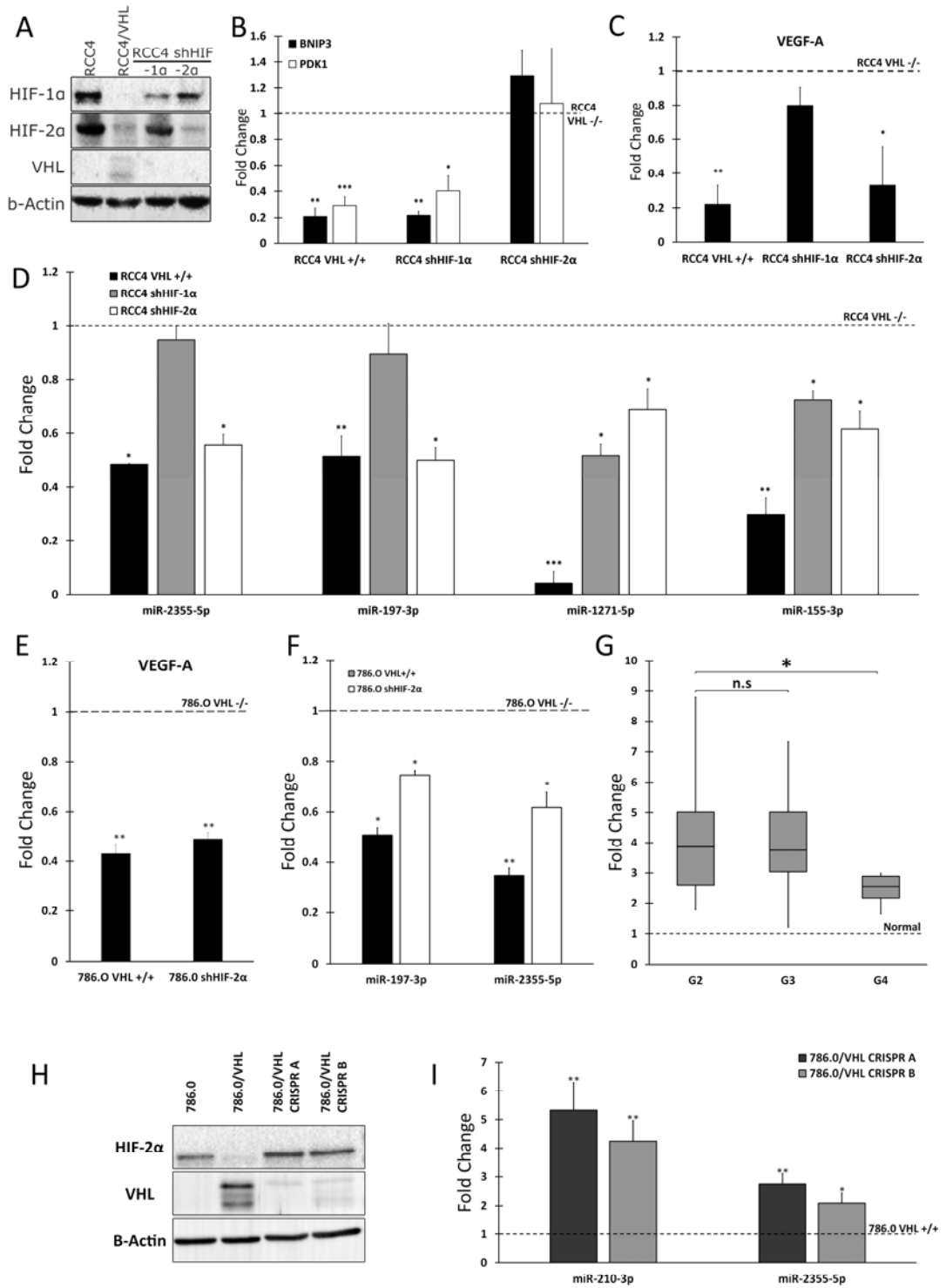


Figure 3.3. VHL-regulated miRNAs are dependent of the HIF- α subunit.

A. Validation of lentiviral stable transfection of shRNA in RCC4 VHL $-/-$ targeting HIF-1 α or HIF-2 α by western blot analysis. β -actin was used as loading control. **B.** Expression of HIF-1 α and **(C)** HIF-2 α targets were measured by qRT-PCR in cells stably transfected with shRNA against HIF-1 α or HIF-2 α . **D.** Quantification of miR-210, -1271, -197 and -2355 by Taqman qPCR to verify their regulation via the HIF- α subunit in cells as described in A. **E.** Stable lentiviral transfection of HIF-2 α targeting shRNA was performed in 786.0 VHL $-/-$. HIF-2 α knockdown was confirmed by expression of HIF-2 α target VEGFA by qRT-PCR. **F.** Quantification of miR-2355 and miR-197 in 786.0 cells as described in E. **G.** miR-2355-fold change expression data versus tumour grades was assessed using the general linear model (GLM) regression analysis on R. **H.** Stable VHL KO cell lines were generated by the CRISPR-Cas9 system in 786.0 VHL $+/+$ KO. VHL and HIF-2 α protein expressions were evaluated by western blot analysis. β -actin was used as a loading control. **(I).** miR-210 and 2355 were quantified by Taqman qPCR. Relative expression of miRNAs and mRNA are normalized to RNU44 and RPLPO expression, respectively, and represented as fold change were compared to RCC4 VHL $-/-$ (dotted line). Mean and SEM were calculated from at least three independent experiments. Statistical analyses were calculated using Student T-test between transfected and control transfected cells where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

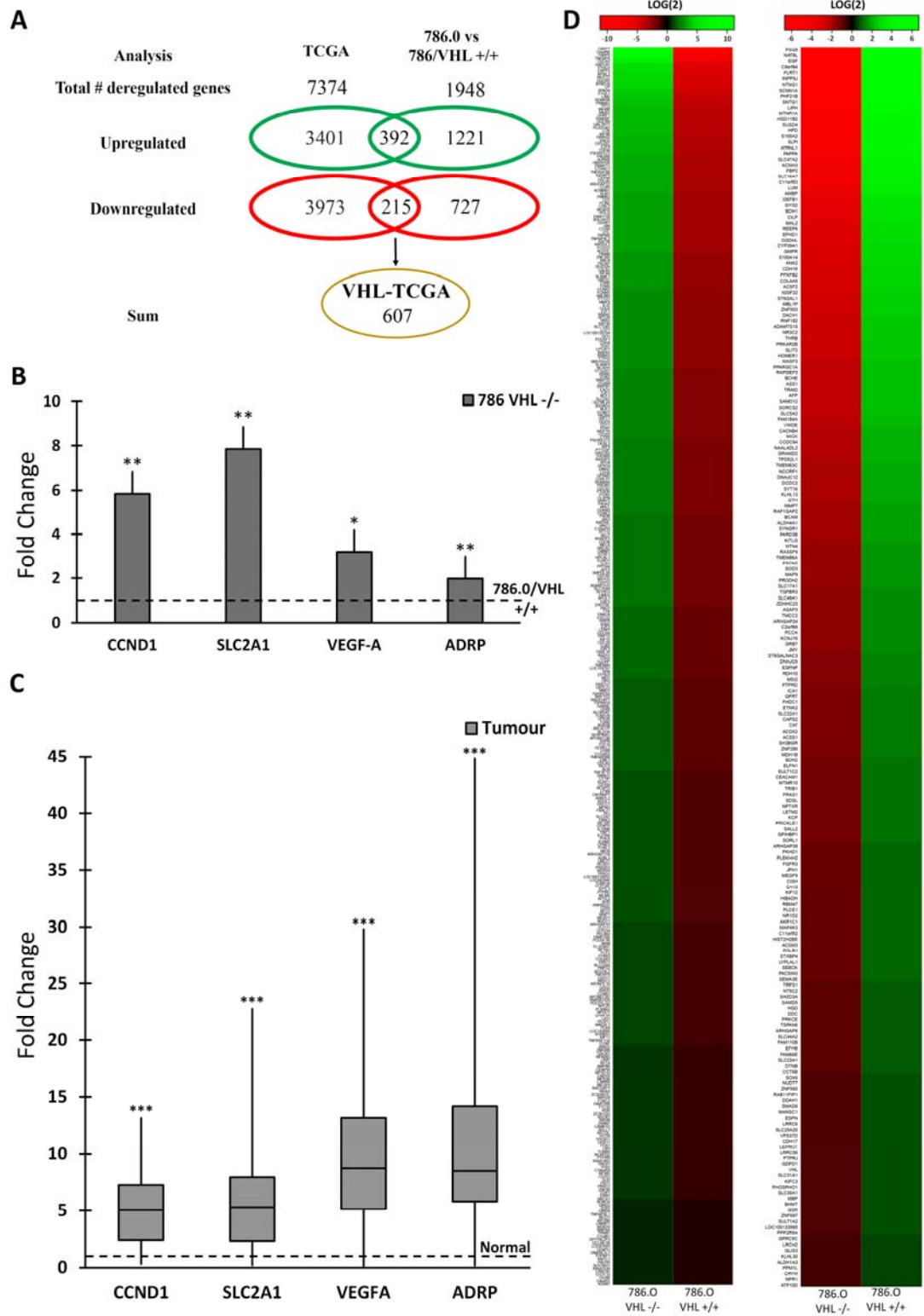


Figure 3.4. Identification of clinically relevant deregulated genes in ccRCC.

A. TCGA mRNA data analysis in patients with VHL $-/-$ tumors compared to normal adjacent tissue showed 7374 genes. In comparison, next generation sequencing in 786.0 compared to their VHL $+/+$ counterparts identified 1948 deregulated genes. A total of 607 common genes were found. **B.** mRNA expression of CCND1, VEGFA, ADRP and GLUT1 (SLC2A1) in 786.0 VHL $-/-$ cells. **C.** Boxplots representing mRNA expression of HIF-targeted genes in patients with ccRCC compared to normal adjacent tissue. **D.** Heatmap of the 607 genes identified in A in 786.0 VHL $-/-$ cells compared to VHL $+/+$ cells. Data are represented as Log₂ fold change. The criteria of selection were based on mRNA that were differently expressed ($p < 0.05$) with a fold change of < 0.67 or > 1.5 in at least 50% of patients and corroborate with *in vitro* 786.0 sequencing data. Relative expression of mRNA was normalized to RPLPO expression, represented as fold change and compared to VHL $-/-$ (dotted line). Statistical analyses were calculated from three independent experiments using Student T-test where $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$.

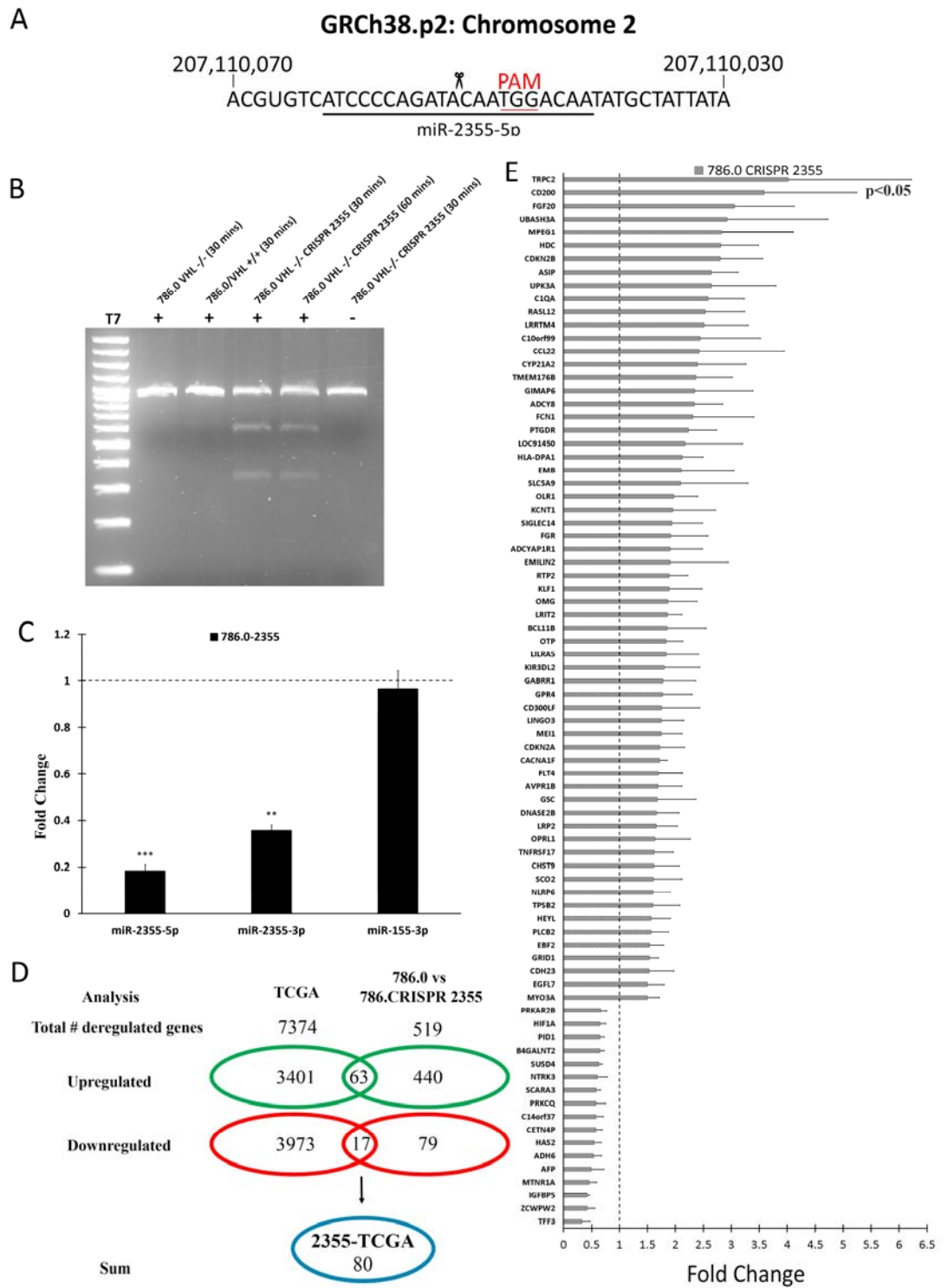


Figure 3.5. CRISPR-Cas9 targeting miR-2355 identified regulated genes in ccRCC.

A. The CRISPR-Cas9 system was used to target miR-2355-5p genomic region to generate a 786.0 miR-2355 knockout cell line. **B.** T7 digestion of an amplified 1000bp genomic DNA region containing miR-2355. **C.** Quantification of miR-2355-5p, -2355-3p and -155-3p in CRISPR-Cas9 miR-2355 cells compared to 786.0 parental cells. **D.** Next generation sequencing in 786.0 compared to their CRISPR miRNA-2355 knockout counterparts identified 519 deregulated genes. Compared to the 7374 genes identified by TCGA, a total of 80 common genes were found. **E.** Deregulated genes in patients potentially regulated by miR-2355. Relative expression of miR was normalised to RNU44 expression. Data are represented as fold change from three independent replicates. Statistical analysis was performed using Student's T-test where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

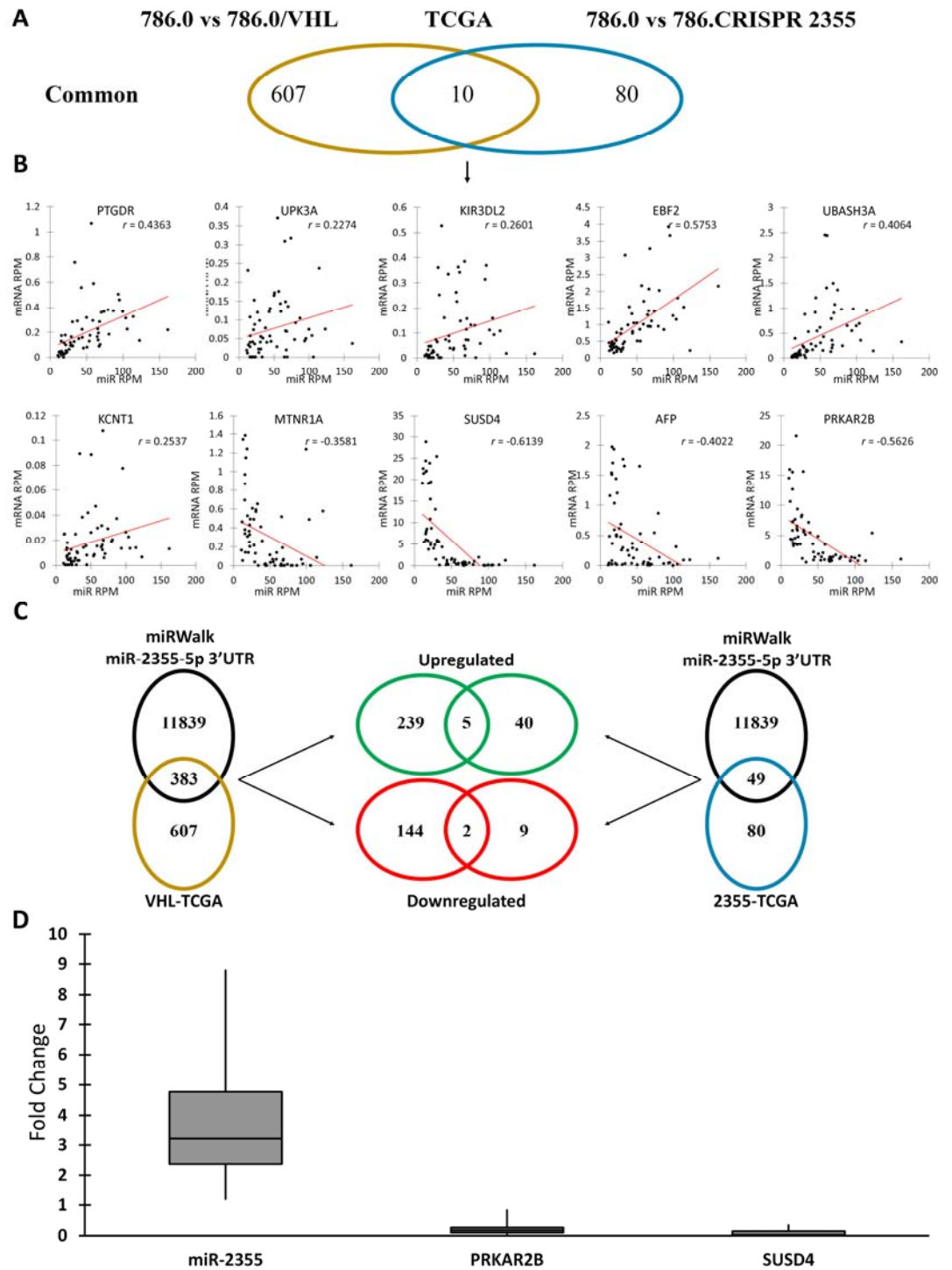


Figure 3.6. Identification of miR-2355 potential targets in VHL-inactivated tumors

A. Venn diagram representing common deregulated genes based on VHL status in cells, in tumor sample and miR-2355 expression. **B.** Correlation between mRNA of the 10 deregulated genes identified in A and miRNA expression. **C.** miRWalk predicted 11839 potential targets for miR-2355. By comparing this list of genes to our previous analyses, we found 5 up- and 2 down-regulated genes. **D.** Boxplots showing that miR-2355 expression increase in VHL-/- tumors correlates with downregulation of PRKAR2B and SUS4 genes expression.

Table 3.1. Clinicopathological characteristics of 34 TCGA RCC patients

Characteristics	# of cases
Age (years)	
<65	20 (58.82%)
≥65	14 (41.18%)
Laterality	
Right	19 (55.88%)
Left	15 (44.12%)
Gender	
Male	25 (73.53%)
Female	9 (26.47%)
Fuhrman Grade	
G1	0 (0%)
G2	10 (29.41%)
G3	16 (47.06%)
G4	8 (23.53%)
Tumour Grade	
T1	12 (35.29%)
T2	4 (11.76%)
T3	16 (47.06%)
T4	2 (5.89%)
TNM Stage	
I	12 (35.29%)
II	4 (11.76%)
III	9 (26.47%)
IV	9 (26.47%)
Lymph Node Metastasis	
N0	14 (41.18%)
NX	20 (58.82%)
Distant Metastasis	
M0	26 (76.47%)
M1	8 (23.53%)

Table 3.2. VHL AA mutations type in a cohort of N=34 RCCs

Sample ID	AA	Type	Reference	Mutation
TCGA-B0-4700-01	G114_splice	Splice	G	T
TCGA-B0-4712-01	L188R	Missense	T	G
TCGA-B0-5402-01	E189	Nonsense	G	T
TCGA-B0-5691-01	Q164fs	FS del	G	-
TCGA-B0-5696-01	L158fs	FS ins	-	T
TCGA-B0-5699-01	S80fs	FS del	GTCC	-
TCGA-B0-5699-01	R79fs	FS ins	-	T
TCGA-B0-5703-01	L184P	Missense	T	C
TCGA-B0-5705-01	L188P	Missense	T	C
TCGA-B0-5709-01	V137fs	FS del	G	-
TCGA-B0-5711-01	N174fs	FS del	A	-
TCGA-B8-5549-01	C162R	Missense	T	C
TCGA-CJ-5672-01	*214L	Nonstop	G	T
TCGA-CJ-5676-01	R161*	Nonsense	C	T
TCGA-CJ-5677-01	L158V	Missense	C	G
TCGA-CJ-5679-01	L89P	Missense	T	C
TCGA-CJ-5680-01	D179fs	FS del	ACAT	-
TCGA-CJ-6030-01	R120G	Missense	A	G
TCGA-CW-5580-01	V130F	Missense	G	T
TCGA-CW-5581-01	S68*	Nonsense	C	A
TCGA-CW-5591-01	Q195	Nonsense	C	T
TCGA-CW-6090-01	L178fs	FS ins	-	G
TCGA-CZ-5455-01	S65*	Nonsense	C	A
TCGA-CZ-5457-01	N90I	Missense	A	T
TCGA-CZ-5458-01	L128H	Missense	T	A
TCGA-CZ-5465-01	L158fs	FS del	T	-
TCGA-CZ-5466-01	V84fs	FS ins	-	T
TCGA-CZ-5469-01	L89H	Missense	T	A
TCGA-CZ-5470-01	H115N	Missense	C	A
TCGA-CZ-5982-01	Q164fs	FS del	G	-
TCGA-CZ-5984-01	R205fs	FS ins	-	A
TCGA-CZ-5985-01	I109fs	FS ins	-	CA
TCGA-CZ-5986-01	V155_splice	Splice	AGGTACTGACGTTTTACTTTTTAAAA	-
TCGA-CZ-5987-01	L188P	Missense	T	C
TCGA-CZ-5989-01	H115fs	FS del	CCTTTGGCTCT	-

Table 3.3. Clinically relevant VHL-dependent microRNAs

miR	NGS FC	TCGA	% UP	% DOWN
miR-210-3p	10.18	20.06	100.0	0
miR-210-5p	6.01	20.03	100.0	0
miR-155-3p	2.15	11.53	97.06	0
miR-2355-5p	2.14	3.09	97.06	0
miR-576-5p	1.66	2.40	85.29	0
miR-340-5p	1.52	2.34	79.41	0
miR-130b-3p	1.54	3.37	76.47	0
miR-1271-3p	20.47	2.87	73.53	2.94
miR-1271-5p	16.75	2.87	73.53	2.94
miR-301b	1.57	2.80	67.65	8.82
miR-1277-3p	1.67	2.44	64.71	8.82
miR-935	3.47	3.14	61.76	29.41
miR-197-3p	2.39	1.55	58.82	0
miR-3605-3p	2.66	1.60	58.82	11.76
miR-19a-3p	1.53	1.54	55.88	5.88
miR-19a-5p	1.53	1.54	55.88	5.88
miR-455-5p	1.87	1.52	50.00	14.71
miR-455.3p	1.86	1.52	50.00	14.71
miR-100-5p	2.81	1.51	50.00	17.65
miR-627-5p	0.37	0.55	26.47	58.82
miR-30c-1-3p	0.53	0.42	20.59	67.65
miR-135b-5p	0.59	0.48	17.65	58.82
miR-135b-3p	0.14	0.48	17.65	58.82
miR-139-5p	0.60	0.55	11.76	58.82
miR-27b-5p	0.53	0.60	2.94	58.82
miR-30a-5p	0.56	0.63	0	55.88
miR-30a-3p	0.54	0.63	0	55.88
miR-26a-1-3p	0.34	0.53	0	61.76
miR-200a-5p	0.52	0.38	0	79.41
miR-30c-2-3p	0.44	0.47	0	79.41
miR-10a-5p	0.67	0.41	0	88.24
miR-138-2-3p	0.27	0.10	0	100.0

Table 3.4. KEGG Pathways of 607 deregulated genes in 786.0 VHL -/-

KEGG Pathway	p-Value	# Genes
hsa04110:Cell cycle	6.97E-08	19
hsa03030:DNA replication	1.23E-04	8
hsa03460:Fanconi anemia pathway	2.59E-04	9
hsa05219:Bladder cancer	0.00160	7
hsa00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	0.00552	8
hsa04114:Oocyte meiosis	0.00831	10
hsa01200:Carbon metabolism	0.00985	10
hsa03440:Homologous recombination	0.01323	5
hsa00051:Fructose and mannose metabolism	0.01858	5
hsa04115:p53 signaling pathway	0.01900	7
hsa01230:Biosynthesis of amino acids	0.03140	7
hsa03430:Mismatch repair	0.03633	4
hsa01130:Biosynthesis of antibiotics	0.04193	13
hsa05212:Pancreatic cancer	0.05451	6
hsa04914:Progesterone-mediated oocyte maturation	0.06100	7
hsa00030:Pentose phosphate pathway	0.06520	4
hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	0.08728	9

Table 3.5. Predicted deregulated targets

Gene	RefseqID	Predicted by
PRKAR2B	NM_002736	miRWalk
SUSD4	XM_005273172	Microt4, miRMap, RNAHybrid, TargetScan
SUSD4	XM_005273173	miRMap, RNAHybrid, TargetScan
SUSD4	XM_005273171	miRMap, RNAHybrid, TargetScan
SUSD4	XM_005273170	miRMap, RNAHybrid, TargetScan
SUSD4	NM_017982	miRMap, RNAHybrid, TargetScan
SUSD4	XM_005273169	miRMap, RNAHybrid, TargetScan
SUSD4	NM_001037175	miRMap
PTGDR	NM_001281469	miRWalk, miRanda, miRMap, RNA Hybrid, TargetScan
PTGDR	XM_005267891	miRWalk, miRanda, miRMap, RNA Hybrid, TargetScan
PTGDR	NM_000953	miRWalk, miRanda, miRMap, RNA Hybrid, TargetScan
KIR3DL2	NM_006737	RNA22
EBF2	NM_022659	RNAHybrid
UBASH3A	NM_018961	miRanda, miRMap, RNAHybrid, TargetScan
UBASH3A	NM_001243467	miRanda, miRMap, RNAHybrid, TargetScan
UBASH3A	NM_001001895	miRanda, miRMap, RNAHybrid, TargetScan
KCNT1	XM_005263407	miRWalk, Microt4, miRanda, miRMap, RNAHybrid, TargetScan
KCNT1	NM_001272003	miRWalk, Microt4, miRanda, miRMap, RNAHybrid, TargetScan
KCNT1	NM_020822	miRWalk, Microt4, miRanda, miRMap, RNAHybrid, TargetScan

Table 3.6. MiRNA-2355 predicted targets fold change expression in ccRCC

Genes	VHL	2355	TCGA	% up	% down
PRKAR2B	0.2622	0.6650	0.1879	3.1%	90.6%
SUSD4	0.5069	0.6316	0.0465	3.1%	96.9%
PTGDR	3.1262	2.2351	4.1519	87.5%	6.3%
KIR3DL2	2.2793	1.8045	7.5844	84.4%	6.3%
EBF2	1.9805	1.5405	3.4697	81.3%	3.1%
UBASH3A	1.5922	2.9258	2.9258	90.6%	3.1%
KCNT1	1.5623	1.9544	1.9544	65.6%	15.6%

4.0 DISCUSSION

L'incidence du cancer du rein est en hausse depuis les 20 dernières années, laquelle est associée avec une augmentation du taux de décès par cette maladie. Différents facteurs peuvent expliquer cette augmentation, notamment une amélioration dans les méthodes de détection pour les petites masses rénales, mais aussi le vieillissement de la population. Le cancer rénal est habituellement détecté aux alentours de l'âge de 63 ans et comme indiqué dans un rapport de la Société Canadienne du Cancer, le vieillissement de la population Canadienne augmentera significativement le nombre de diagnostics au cours de la prochaine décennie (tous types de cancer et non seulement le rein) (Karakiewicz et al., 2008; Society, 2016). Lorsque les tumeurs rénales atteignent le stade métastatique, les cellules cancéreuses sont particulièrement résistantes aux traitements de chimiothérapie (Rini, Campbell, & Escudier, 2009). Une meilleure compréhension des différents types de cancer rénaux est nécessaire afin de développer de nouvelles options thérapeutiques et aussi d'identifier des biomarqueurs permettant de détecter de façon précoce la maladie.

L'inactivation, par mutations ou hyperméthylation du promoteur, du gène de suppression tumorale VHL est à l'origine de la majorité des développements des carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCC) (Dalglish et al., 2010; Dulaimi et al., 2004). Ainsi, les traitements utilisés en clinique ciblent principalement les cascades de signalisation impliquées dans la réponse hypoxique, soit les facteurs angiogéniques et la voie mTOR et donc les cellules endothéliales (Linehan & Srinivasan, 2013). Le laboratoire du professeur Turcotte s'intéresse à la possibilité de cibler les cellules dont VHL est inactivé afin de développer une thérapie ciblée pour ces cellules cancéreuses spécifiquement. Les cellules normales seraient alors peu touchées par ce traitement.

La biogénèse des miARNs est un processus très régulé et l'expression de ces molécules est spécifique au tissu ainsi qu'à son stade de développement. Malgré plusieurs études et l'identification récente de plusieurs miARNs contribuant au développement des tumeurs rénales, encore peu d'études prennent en compte le

statut de VHL lors d'études établissant le profil de miARNs dans les ccRCC (J. Cao et al., 2016; Khella et al., 2015; Lou et al., 2017; Mikhaylova et al., 2012; Neal et al., 2010; Szabo et al., 2016; Xiao et al., 2015). Étant donné le rôle important de VHL en tant que suppresseur de tumeurs ainsi que le potentiel des miARNs pour le traitement, le diagnostic et le pronostic, nous nous sommes intéressés à étudier les miARNs régulés par le gène VHL chez les ccRCCs.

Par séquençage à haut débit, l'expression d'un total de 2578 miARNs a été étudiée chez des cellules RCC4 parentales ayant une mutation dans le gène VHL (VHL^{-/-}) comparativement à sa contrepartie où le gène VHL a été réintroduit de façon stable (VHL^{+/+}), afin d'établir un profil d'expression des miARNs régulés par le gène VHL. Parmi un total de 1186 miARNs identifiés dans cette étude, l'expression de 183 miARNs s'est avérée différemment exprimée de façon significative (Figure 3.1A). Nous avons pu identifier 87 et 96 miARNs dont l'expression est régulée à la hausse ou à la baisse, respectivement. Alors que certains avaient déjà été rapportés dans la littérature tels que miR-210, -155, -30, -200 nous avons pu identifier plusieurs autres nouveaux miARNs. Parmi la liste, un total de 22 miARNs fut sélectionné et validé dans trois modèles cellulaires de ccRCCs ayant un VHL inactif (VHL^{-/-}), soit les RCC4, les 786.0 et les RCC10, versus leurs contreparties avec le gène VHL actif (VHL^{+/+}) (Figure 3.1B et 3.1C). Alors que seuls 4 miARNs se sont validés dans chacune des 3 lignées cellulaires, soit miR-2355, miR-155, miR-495 et miR-210, 10 miARNs se sont validés dans au moins 2 lignées cellulaires, soit miR-340, miR-203, miR-154, miR-381, miR-197, miR-363, miR-1271, miR-138, miR-210 et miR-152. Ces résultats démontrent l'hétérogénéité des ccRCCs observée au niveau clinique.

Afin d'aller un peu plus loin dans notre analyse et corroborer nos données *in vitro* avec ceux retrouvés chez des patients atteints de ccRCCs, nous avons utilisé les données provenant de la base de données TCGA disponible sur le site web

(<http://cancergenome.nih.gov/>) (Cerami et al., 2012; J. Gao et al., 2013). De plus, nous avons utilisé cBioPortal (www.cbioportal.org) afin d'identifier une cohorte de 34 patients atteints de ccRCCs mutés pour VHL (Tableaux 3.1 et 3.2, Figure 3.2A). Les critères de sélection pour ces patients furent (i) une mutation sur le gène VHL (ii) la disponibilité des données de séquençages de miARNs normalisées de la tumeur ainsi que du tissu adjacent normal (associée à la base de données TCGA). Il est important de noter que même si VHL est le gène le plus fréquemment muté chez les ccRCCs, d'autres mutations sur différents gènes sont aussi rapportées. Cette cohorte de 34 patients comprend un total de 252 différents gènes mutés incluant VHL, PBRM1, MUC4, SETD2, BAP1, MTOR, KRTAP4-11, COL5A3, ERBB4 et SLITRK6 (Figure 3.2B). La plupart de ces gènes ont été précédemment rapporté lors de la caractérisation des tumeurs rénales comprises dans la base de données TCGA, supportant une fois de plus l'hétérogénéité de ces tumeurs (The cancer genome atlas network, 2013). PBRM1, SETD2, BAP1, MTOR, MUC4 et ERBB4 ont également été rapporté chez les ccRCCs (Ghosh et al., 2015; Gu et al., 2015; Shinagare et al., 2015). Par contre, la mutation ainsi qu'une sous-expression de ERBB4 est une caractéristique qui ne semble pas être spécifique au ccRCC, mais commune des RCC puisque sa sous-expression est également retrouvée chez les pRCC et chRCC (Thomasson, Hedman, Ljungberg, & Henriksson, 2012). Aucune dérégulation ou mutation de SLITRK6, COL5A3 et KRTAP4-11 est rapportée chez les ccRCCs.

En comparant les données normalisées de miARNs (reads per million, RPM) de la tumeur versus le tissu normal provenant du même patient, un total de 246 miARNs (Figure 3.2C) furent identifiés comme étant dérégulés en absence de VHL chez les ccRCCs. En comparant les miARNs identifiés *in vitro* avec ceux identifiés dans notre cohorte de patients, nous avons généré un profil de 32 miARNs VHL-dépendant qui sont dérégulés chez les ccRCCs (Tableau 3.3). Ceux-ci incluent 8 miARNs que nous avons préalablement quantifiés dans nos trois lignées cellulaires, soit miR-210, -155, -2355, -576, -340, -1271, -130b et -

197. L'expression de ces miARNs est régulée à la hausse chez les tumeurs ccRCC versus le tissu normal adjacent (Figure 3.2D). À nos connaissances, seuls les miR-210, -27b, -100, -30c, -30a, -200a, -155, -340, -576, -138, -139, -130b, -19a, -10a, -455, -1271 ont été rapportés dans la littérature (Y. Gao et al., 2016; Gu et al., 2015; Liang et al., 2013; Ma et al., 2016; Mathew et al., 2014; Osanto et al., 2012; Redova et al., 2013; Wotschofsky et al., 2012; Wu et al., 2012). Notre étude a permis d'identifier plus d'une dizaine de nouveaux miARNs chez les ccRCCs dont l'expression varie en fonction du statut de VHL et ce, en utilisant différents modèles *in vitro* et une cohorte de patients atteints de ccRCC et ayant une mutation sur le gène VHL.

Puisque VHL joue un rôle important dans la régulation de HIF et que celui-ci régule plusieurs processus cellulaires impliqués dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses, nous nous sommes intéressés à savoir si certains de ces miARNs sont régulés via un mécanisme dépendant de HIF- α . Pour ce faire, des cellules RCC4 VHL $-/-$, qui expriment des niveaux élevés de HIF-1 α et HIF-2 α , ont été stablement transfectées avec un shRNA dirigé contre HIF-1 α (RCC4 shHIF-1 α) ou HIF-2 α (RCC4 shHIF-2 α). Cette approche nous a permis de réduire les niveaux des sous-unités des HIF- α ainsi que de leurs cibles (Figure 3.3A, 3.3B, 3C). Suite à la diminution de l'expression de HIF-1 α ou HIF-2 α , une diminution des niveaux de miR-1271-5p et miR-155-3p fut observée (Figure 3.3D), confirmant que la régulation de ceux-ci est HIF-dépendant. D'autre part, une diminution des niveaux de HIF-2 α a mené à une réduction des niveaux de miR-2355-5p et miR-197-3p uniquement (Figure 3.3D). Étant donné que l'inhibition de HIF-2 α dans les modèles de xénogreffes chez la souris est suffisante pour inhiber la croissance des ccRCCs, la dépendance de ces deux miARNs pour HIF-2 α a attiré notre attention. Puisque les cellules RCC4 et les RCC10 proviennent de tumeurs de type H1H2 tandis que les 786.0 sont de type H2, nous avons décidé de poursuivre l'étude des miARNs dépendant de HIF-2 α en utilisant les cellules 786.0. Conséquemment, ces cellules ont été transfectées de façon stable avec un

shRNA dirigé contre HIF-2 α (Figure 3.3E) validant le rôle de HIF-2 α dans la régulation de miR-2355-5p et miR-197-3p (Figure 3.3F). À ce jour, un seul article se penche sur miR-2355 qui a été étudié dans le cancer du sein (Wei et al., 2015). Parce que ce miARN est exprimé à la hausse dans 97% des patients atteints de ccRCC, qu'il agit de manière dépendante de HIF-2 α , qu'il est peu étudié et pourrait démontrer un rôle dans le développement du cancer du rein, miR-2355 a été sélectionné pour des études subséquentes. En investiguant davantage les données de la cohorte pour ce miARN, les données démontrent que son expression diminue de façon significative avec le grade de la tumeur (Figure 3.3G). Il serait intéressant de poursuivre cette validation sur une cohorte indépendante pour voir un lien entre le niveau d'expression de miR-2355 dans les métastases versus les tumeurs primaires. Finalement, nous avons démontré la dépendance de miR-2355 au statut de VHL en utilisant les cellules 786.0 exprimant VHL^{+/+} dans lesquelles nous avons utilisé le système CRISPR-Cas9 pour diminuer les niveaux de VHL et démontré une augmentation des niveaux de ce miARN (Figure 3.3H, 3.3I).

Par la suite, nous avons comparé les données de séquençage à haut débit provenant des cellules 786.0 ^{-/-} et 786.0 VHL ^{+/+} obtenues dans notre laboratoire avec les données d'ARNm séquencées dans la cohorte de patients obtenue via la base de données TCGA. Par cette approche, nous avons pu identifier un total de 607 gènes dérégulés entre ces deux analyses (Figure 3.4A). Parmi les gènes analysés, une augmentation de VEGFA, ADRP, SLC2A1 et CCND1 est observée chez les 786.0 VHL ^{-/-} ainsi que dans la cohorte de patients, corroborant la littérature (Figure 3.4B, 3.4C) (Zeng, Que, Zhang, & Hu, 2014). Puis, nous avons utilisé l'annotation fonctionnelle DAVID 6.8 pour ces 607 gènes identifiés *in vitro* et *in situ* et démontré que l'inactivation du gène VHL mènerait à la dérégulation de différentes cascades (KEGG pathways) dont le cycle cellulaire et le métabolisme (Tableau 3.4). Les RCCs étant connus comme une maladie métabolique. Étant donnée la sur-expression des sous-unités HIF- α en absence de VHL qui ont comme rôle la régulation de diverses de protéines impliqués dans le métabolisme

(GLUT1, PGK1, PFKL, LDHA, HK1, HK2), il n'est pas surprenant de voir la dérégulation des cascades du cycle pentose phosphate, fructose et mannose, de carbone, de biosynthèse d'acides aminés et de la glycolyse/gluconeogenèse (Linehan et al., 2010; Zaravinos et al., 2014; Semenza., 2003). De plus, des dérégulations du cycle cellulaire (via HIF-2 α /CCND1) ainsi que la réplication de l'ADN (via HIF-1 α /C-Myc) sont aussi des mécanismes cellulaires importants associés au RCCs (Gordan et al., 2008; Macheret & Halazonetis, 2015; Sandhu & Slingerland, 2000; Raval et al., 2005).

Afin de mieux caractériser les cascades régulées par miR-2355 et identifier des cibles potentielles pour ce miARN, nous avons utilisé une fois de plus le système CRISPR-Cas9 pour préparer une lignée cellulaire 786.0 VHL -/- exprimant des niveaux faibles de miR-2355 (786.0 CRISPR-2355). Pour ce faire, un bris fut effectué dans la séquence SEED du miR-2355-5p (Figure 3.5A) qui fut validé par T7 endonucléase (Figure 3.5B), menant à une inhibition de plus de 80% et 65% des niveaux de miR-2355-5p et -3p respectivement (Figure 3.5C). Aucune différence dans le niveau d'expression d'autres miARNs VHL-dépendant (miR-155) n'a été observée suggérant que les niveaux globaux de miARNs dans la cellule n'ont pas été affecté par le système CRISPR/Cas9. Ces résultats indiquent que les changements observés dans ces cellules sont via la dérégulation des cascades miR-2355-dépendant. Une fois la lignée établie, nous avons effectué un séquençage à haut débit sur les cellules 786.0 parentales et les CRISPR-2355. Par cette approche, nous avons identifié un total de 519 gènes dont l'expression varie en fonction du niveau de miR-2355 (Figure 3.5D). En comparant cette liste de gènes aux 7374 identifiés chez les patients, nous avons déterminé une liste de 80 gènes dérégulés chez les patients, lesquels seraient potentiellement régulés par miR-2355 (Figure 3.5E). En poussant un peu plus loin nos analyses, nous avons comparé la liste des 607 gènes régulés par le statut de VHL (*in vitro* et chez les patients) à celle des 80 gènes différemment exprimés selon le niveau de miR-2355 pour identifier un total de 10 gènes communs (Figure 3.6A et 3.6B). Des

coefficients de corrélation ont été calculés et démontrent que la régulation de ces gènes *in vitro* et chez les patients serait le résultat d'un déséquilibre de miR-2355 suite à la perte de VHL.

Finalement, la base de données miRWalk regroupant plusieurs algorithmes de prédiction d'interaction entre un miARN et l'ARNm fut utilisée afin de prédire des cibles potentielles de miR-2355-5p. Plus de 11 839 gènes ont été identifiés comme cibles potentielles du miARN-2355-5p. Commun entre toutes nos analyses, on retrouve 2 gènes sous-exprimés (PRKAR2B et SUSD4) et 5 surexprimés (PTGDR, KIR3DL2, EBF2, UBASH3A (CLIP4) et KCNT1) (Figure 3.6D, Tableaux 3.5, 3.6). Parmi ceux-ci, seul UBASH3A (CLIP4) est rapporté dans les ccRCCs et sa surexpression augmente la migration des cellules (Ahn et al., 2016). Cette surexpression est également observée chez le cancer du sein démontrant aussi un rôle dans l'invasion et la migration cellulaire (S. T. Lee et al., 2013). Contrairement, PRKAR2B, SUSD4 EBF2 et PTGDR n'ont pas été rapportés chez les RCCs mais ils ont été étudiés chez d'autres cancers (Battistella et al., 2016; Englund et al., 2015; Kalmar et al., 2015; Loilome et al., 2011; Patino-Garcia et al., 2009). Selon nos recherches, aucun lien entre KCNT1 et le cancer n'a été rapporté. Parmi ces gènes, seuls PRKAR2B et SUSD4 sont sous-exprimés suggérant ceux-ci comme cibles directes de miR-2355-5p. Contrairement, les gènes surexprimés sont probablement un effet indirect puisqu'un haut niveau de miARN régule, dans la majorité des cas, négativement l'expression de ces gènes cibles.

La Sushi Domain-Containing Protein 4 (SUSD4) est une protéine peu étudiée. Le gène code pour deux isoformes, soit SUSD4a et SUSD4b, et ont comme rôle l'inhibition des compléments affectant le système immunitaire (Holmquist, Okroj, Nodin, Jirstrom, & Blom, 2013). Seule une étude effectuée dans le cancer du sein démontre que son expression est associée à un meilleur

pronostic et que sa présence diminue la migration et la croissance de cellules cancéreuses du sein *in vitro* (Englund et al., 2015). Cette étude démontre également que l'expression de SUSD4 augmente chez les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ suite à leur stimulation, suggérant qu'il est impliqué dans la fonction de ces cellules et supportant son rôle dans le système immunitaire. Pour sa part, la protéine kinase A (PKA) est une enzyme composée de 2 sous-unités catalytiques (C) et deux sous-unités régulatrices (R). L'inactivation de la sous-unité régulatrice 2B de la protéine kinase A (PRKAR2B) chez une lignée adrénocorticale mène à une augmentation de la survie et une réduction de l'apoptose (Sha et al., 2017). Cette même étude démontre qu'une surexpression de PRKAR2B est observée dans les tumeurs métastatiques de la prostate démontrant un rôle dans le cancer. De plus, une étude intéressante démontre qu'une réduction de PRKAR2B mènerait à une augmentation des niveaux de HIF-1 α dans le cancer de la prostate et d'ostéosarcome (Schoolmeesters et al., 2012). Cette caractéristique est d'intérêt avec notre étude puisque nos résultats suggèrent que PRKAR2B pourrait être impliqué dans l'hypoxie via sa régulation par miR-2355 qui lui, est influencé par les niveaux de HIF-2 α .

Comme perspectives futurs, il serait premièrement nécessaire de valider par RT-qPCR SYBR la dérégulation de l'expression de PRKAR2B/SUSD4 chez les 786.0 VHL +/+ et les 786.0 VHL -/- CRISPR miR-2355 comparativement au 786.0 VHL -/-. Étant donné que la régulation de miR-2355 est HIF-2 α -dépendant, il serait également intéressant d'étudier leur niveau d'expression chez les lignées shHIF-2 α . Deuxièmement, afin de mieux caractériser l'interaction entre et le miR-2355 et ces cibles, des essais luciférase entre miARN et la région 3'UTR de ses cibles potentielles. Dernièrement, des études de perte et de gain, *in vitro* et *in vivo*, à l'aide de mimique et d'inhibiteur de miR-2355 ainsi que ces cibles validées serait d'intérêt afin de déterminer plus spécifiquement le rôle chez ces tumeurs et la contribution de leur dérégulation chez le développement des ccRCCs.

En conclusion, nous avons identifié 32 miARNs dont l'expression varie en fonction du statut de VHL dans les ccRCCs. Parmi ceux-ci, miR-2355 a suscité notre intérêt puisqu'il est i) surexprimé chez 97% des patients atteints de ccRCC dont VHL est muté, ii) que son expression varie en fonction du grade et iii) qu'il est HIF-2 α dépendant. À l'aide de séquençage à haut débit et des données de la base de données TCGA, nous avons identifié SUSL4 et PRKAR2B comme cible potentielles de miR-2355.

RÉFÉRENCES

- Ahn, J., Han, K. S., Heo, J. H., Bang, D., Kang, Y. H., Jin, H. A., . . . Ham, W. S. (2016). FOXC2 and CLIP4 : a potential biomarker for synchronous metastasis of ≤ 7 -cm clear cell renal cell carcinomas. *Oncotarget*, 7(32), 51423-51434. doi:10.18632/oncotarget.9842
- Allory, Y., Culine, S., & de la Taille, A. (2011). Kidney cancer pathology in the new context of targeted therapy. *Pathobiology*, 78(2), 90-98. doi:10.1159/000315543
- Ambros, V., & Horvitz, H. R. (1984). Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 226(4673), 409-416.
- Ang, S. O., Chen, H., Hirota, K., Gordeuk, V. R., Jelinek, J., Guan, Y., . . . Prchal, J. T. (2002). Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet*, 32(4), 614-621. doi:10.1038/ng1019
- Arjumand, W., & Sultana, S. (2012). Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma. *Tumour Biol*, 33(1), 9-16. doi:10.1007/s13277-011-0257-3
- Avery-Kiejda, K. A., Braye, S. G., Forbes, J. F., & Scott, R. J. (2014). The expression of Dicer and Drosha in matched normal tissues, tumours and lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 253. doi:10.1186/1471-2407-14-253
- Bader, A. G. (2012). miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet*, 3, 120. doi:10.3389/fgene.2012.00120
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci*, 9(3), 193-199. doi:10.7150/ijms.3635
- Battistella, M., Janin, A., Jean-Louis, F., Collomb, C., Leboeuf, C., Sicard, H., . . . Michel, L. (2016). KIR3DL2 (CD158k) is a potential therapeutic target in primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. *Br J Dermatol*, 175(2), 325-333. doi:10.1111/bjd.14626
- Belair, C. D., Paikari, A., Moltzahn, F., Shenoy, A., Yau, C., Dall'Era, M., . . . Belloch, R. (2015). DGCR8 is essential for tumor progression following PTEN loss in the prostate. *EMBO Rep*, 16(9), 1219-1232. doi:10.15252/embr.201439925
- Bohnsack, M. T., Czapinski, K., & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), 185-191.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.
- Brugarolas, J. (2014). Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 32(18), 1968-1976. doi:10.1200/JCO.2012.45.2003
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957-1966. doi:10.1261/rna.7135204

- Cai, Y., Li, H., & Zhang, Y. (2016). Downregulation of microRNA-206 suppresses clear cell renal carcinoma proliferation and invasion by targeting vascular endothelial growth factor A. *Oncol Rep*, 35(3), 1778-1786. doi:10.3892/or.2015.4538
- Cairns, P. (2010). Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark*, 9(1-6), 461-473. doi:10.3233/CBM-2011-0176
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6(11), 857-866. doi:10.1038/nrc1997
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., . . . Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15524-15529. doi:10.1073/pnas.242606799
- Cao, J., Liu, J., Xu, R., Zhu, X., Liu, L., & Zhao, X. (2016). MicroRNA-21 stimulates epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenesis in clear cell renal cells. *Mol Med Rep*, 13(1), 75-82. doi:10.3892/mmr.2015.4568
- Cao, Y., Bryan, T. M., & Reddel, R. R. (2008). Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells. *Cancer Sci*, 99(6), 1092-1099. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00815.x
- Carmell, M. A., & Hannon, G. J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 11(3), 214-218. doi:10.1038/nsmb729
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., . . . Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*, 2(5), 401-404. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095
- Chae, E. J., Kim, J. K., Kim, S. H., Bae, S. J., & Cho, K. S. (2005). Renal cell carcinoma: analysis of postoperative recurrence patterns. *Radiology*, 234(1), 189-196. doi:10.1148/radiol.2341031733
- Chan, D. A., Sutphin, P. D., Nguyen, P., Turcotte, S., Lai, E. W., Banh, A., . . . Giaccia, A. J. (2011). Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Sci Transl Med*, 3(94), 94ra70. doi:10.1126/scitranslmed.3002394
- Cheadle, J. P., Reeve, M. P., Sampson, J. R., & Kwiatkowski, D. J. (2000). Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Hum Genet*, 107(2), 97-114.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., & Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*, 276(12), 9519-9525. doi:10.1074/jbc.M010144200
- Chen, J., Zhang, D., Zhang, W., Tang, Y., Yan, W., Guo, L., & Shen, B. (2013). Clear cell renal cell carcinoma associated microRNA expression signatures identified by an integrated bioinformatics analysis. *J Transl Med*, 11, 169. doi:10.1186/1479-5876-11-169
- Chen, L., Han, L., Zhang, K., Shi, Z., Zhang, J., Zhang, A., . . . Kang, C. (2012). VHL regulates the effects of miR-23b on glioma survival and invasion via suppression of HIF-1alpha/VEGF and beta-catenin/Tcf-4 signaling. *Neuro Oncol*, 14(8), 1026-1036. doi:10.1093/neuonc/nos122

- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, *436*(7051), 740-744. doi:10.1038/nature03868
- Cheng, W. S., Farrow, G. M., & Zincke, H. (1991). The incidence of multicentricity in renal cell carcinoma. *J Urol*, *146*(5), 1221-1223.
- Chin, A. I., Lam, J. S., Figlin, R. A., & Beldegrun, A. S. (2006). Surveillance strategies for renal cell carcinoma patients following nephrectomy. *Rev Urol*, *8*(1), 1-7.
- Chitalia, V. C., Foy, R. L., Bachschmid, M. M., Zeng, L., Panchenko, M. V., Zhou, M. I., . . . Cohen, H. T. (2008). Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL. *Nat Cell Biol*, *10*(10), 1208-1216. doi:10.1038/ncb1781
- Chow, W. H., Dong, L. M., & Devesa, S. S. (2010). Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*, *7*(5), 245-257. doi:10.1038/nrurol.2010.46
- Christopher, A. F., Kaur, R. P., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., & Bansal, P. (2016). MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res*, *7*(2), 68-74. doi:10.4103/2229-3485.179431
- Clifford, S. C., Astuti, D., Hooper, L., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., & Maher, E. R. (2001). The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma. *Oncogene*, *20*(36), 5067-5074. doi:10.1038/sj.onc.1204602
- Cohen, H. T., & McGovern, F. J. (2005). Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, *353*(23), 2477-2490. doi:10.1056/NEJMra043172
- Corless, C. L., Kibel, A. S., Iliopoulos, O., & Kaelin, W. G., Jr. (1997). Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Hum Pathol*, *28*(4), 459-464.
- da Silva, N. F., Gentle, D., Hesson, L. B., Morton, D. G., Latif, F., & Maher, E. R. (2003). Analysis of the Birt-Hogg-Dube (BHD) tumour suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma and colorectal cancer. *J Med Genet*, *40*(11), 820-824.
- Dalglish, G. L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., . . . Futreal, P. A. (2010). Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*, *463*(7279), 360-363. doi:10.1038/nature08672
- Delahunt, B., & Eble, J. N. (1997). Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol*, *10*(6), 537-544.
- Delahunt, B., Eble, J. N., McCredie, M. R., Bethwaite, P. B., Stewart, J. H., & Bilous, A. M. (2001). Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol*, *32*(6), 590-595. doi:10.1053/hupa.2001.24984
- DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev*, *29*(2), 309-316. doi:10.1007/s10555-010-9223-6

- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, *432*(7014), 231-235. doi:10.1038/nature03049
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Sevignani, C., Wentzel, E., . . . Thomas-Tikhonenko, A. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*, *38*(9), 1060-1065. doi:10.1038/ng1855
- Dulaimi, E., Ibanez de Caceres, I., Uzzo, R. G., Al-Saleem, T., Greenberg, R. E., Polascik, T. J., . . . Cairns, P. (2004). Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res*, *10*(12 Pt 1), 3972-3979. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0175
- Dweep, H., & Gretz, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods*, *12*(8), 697. doi:10.1038/nmeth.3485
- Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., & Gretz, N. (2011). miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform*, *44*(5), 839-847. doi:10.1016/j.jbi.2011.05.002
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, *35*(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Englund, E., Reitsma, B., King, B. C., Escudero-Esparza, A., Owen, S., Orimo, A., . . . Blom, A. M. (2015). The human complement inhibitor Sushi Domain-Containing Protein 4 (SUSD4) expression in tumor cells and infiltrating T cells is associated with better prognosis of breast cancer patients. *BMC Cancer*, *15*, 737. doi:10.1186/s12885-015-1734-7
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., & Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, *27*(11), 3970-3981. doi:10.1128/MCB.00128-07
- Fan, Y., Li, H., Ma, X., Gao, Y., Bao, X., Du, Q., . . . Zhang, X. (2016). Dicer suppresses the malignant phenotype in VHL-deficient clear cell renal cell carcinoma by inhibiting HIF-2alpha. *Oncotarget*, *7*(14), 18280-18294. doi:10.18632/oncotarget.7807
- Fenner, A. (2013). Genetics: a molecular atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*, *10*(9), 485. doi:10.1038/nrclinonc.2013.122
- Ferguson, E. L., Sternberg, P. W., & Horvitz, H. R. (1987). A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *326*(6110), 259-267. doi:10.1038/326259a0
- Ferrero, S., Vaira, V., Del Gobbo, A., Vicentini, L., Bosari, S., Beck-Peccoz, P., . . . Lania, A. G. (2015). Different expression of protein kinase A (PKA) regulatory subunits in normal and neoplastic thyroid tissues. *Histol Histopathol*, *30*(4), 473-478. doi:10.14670/HH-30.473
- Fisher, R. I., Rosenberg, S. A., & Fyfe, G. (2000). Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am*, *6 Suppl 1*, S55-57.
- Fukuoka, T., Honda, M., Namiki, M., Tada, Y., Matsuda, M., & Sonoda, T. (1987). Renal cell carcinoma with heterotopic bone formation. Case report and review of the Japanese literature. *Urol Int*, *42*(6), 458-460.

- Furge, K. A., Tan, M. H., Dykema, K., Kort, E., Stadler, W., Yao, X., . . . Teh, B. T. (2007). Identification of deregulated oncogenic pathways in renal cell carcinoma: an integrated oncogenomic approach based on gene expression profiling. *Oncogene*, *26*(9), 1346-1350. doi:10.1038/sj.onc.1210256
- Fyfe, G., Fisher, R. I., Rosenberg, S. A., Sznol, M., Parkinson, D. R., & Louie, A. C. (1995). Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol*, *13*(3), 688-696.
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., . . . Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, *6*(269), p11. doi:10.1126/scisignal.2004088
- Gao, Y., Ma, X., Yao, Y., Li, H., Fan, Y., Zhang, Y., . . . Zhang, X. (2016). miR-155 regulates the proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells by targeting E2F2. *Oncotarget*, *7*(15), 20324-20337. doi:10.18632/oncotarget.7951
- Gerlinger, M., Horswell, S., Larkin, J., Rowan, A. J., Salm, M. P., Varela, I., . . . Swanton, C. (2014). Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet*, *46*(3), 225-233. doi:10.1038/ng.2891
- Ghosh, A. P., Marshall, C. B., Coric, T., Shim, E. H., Kirkman, R., Ballestas, M. E., . . . Sudarshan, S. (2015). Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. *Oncotarget*, *6*(20), 17895-17910. doi:10.18632/oncotarget.4963
- Giacinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, *25*(38), 5220-5227. doi:10.1038/sj.onc.1209615
- Gill, A. J., Hes, O., Papatomas, T., Sedivcova, M., Tan, P. H., Agaimy, A., . . . Trpkov, K. (2014). Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient renal carcinoma: a morphologically distinct entity: a clinicopathologic series of 36 tumors from 27 patients. *Am J Surg Pathol*, *38*(12), 1588-1602. doi:10.1097/PAS.0000000000000292
- Gnarra, J. R., Ward, J. M., Porter, F. D., Wagner, J. R., Devor, D. E., Grinberg, A., . . . Linehan, W. M. (1997). Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(17), 9102-9107.
- Goodwin, M. L., Gladden, L. B., Nijsten, M. W., & Jones, K. B. (2014). Lactate and cancer: revisiting the warburg effect in an era of lactate shuttling. *Front Nutr*, *1*, 27. doi:10.3389/fnut.2014.00027
- Gordan, J. D., Lal, P., Dondeti, V. R., Letrero, R., Parekh, K. N., Oquendo, C. E., . . . Nathanson, K. L. (2008). HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell*, *14*(6), 435-446. doi:10.1016/j.ccr.2008.10.016
- Gossage, L., Eisen, T., & Maher, E. R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer*, *15*(1), 55-64. doi:10.1038/nrc3844
- Gowrishankar, B., Ibragimova, I., Zhou, Y., Slifker, M. J., Devarajan, K., Al-Saleem, T., . . . Cairns, P. (2014). MicroRNA expression signatures of stage, grade, and progression in clear cell RCC. *Cancer Biol Ther*, *15*(3), 329-341. doi:10.4161/cbt.27314

- Greef, B., & Eisen, T. (2016). Medical treatment of renal cancer: new horizons. *Br J Cancer*, *115*(5), 505-516. doi:10.1038/bjc.2016.230
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, *123*(4), 631-640. doi:10.1016/j.cell.2005.10.022
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, *432*(7014), 235-240. doi:10.1038/nature03120
- Griffin, N., Gore, M. E., & Sohaib, S. A. (2007). Imaging in metastatic renal cell carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, *189*(2), 360-370. doi:10.2214/AJR.07.2077
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., . . . Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, *106*(1), 23-34.
- Gu, L., Li, H., Chen, L., Ma, X., Gao, Y., Li, X., . . . Zhang, X. (2015). MicroRNAs as prognostic molecular signatures in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, *6*(32), 32545-32560. doi:10.18632/oncotarget.5324
- Guil, S., & Esteller, M. (2009). DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(1), 87-95. doi:10.1016/j.biocel.2008.09.005
- Hamada, S., Satoh, K., Miura, S., Hirota, M., Kanno, A., Masamune, A., . . . Shimosegawa, T. (2013). miR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin. *J Cell Physiol*, *228*(6), 1255-1263. doi:10.1002/jcp.24280
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353-364.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hannun, Y. A. (1997). Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, *89*(6), 1845-1853.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*, *62*(11), 1180-1190.
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., . . . Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, *435*(7043), 828-833. doi:10.1038/nature03552
- Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P., & Krek, W. (2003). Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol*, *5*(1), 64-70. doi:10.1038/ncb899
- Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., . . . et al. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*(21), 9700-9704.

- Hickey, M. M., Lam, J. C., Bezman, N. A., Rathmell, W. K., & Simon, M. C. (2007). von Hippel-Lindau mutation in mice recapitulates Chuvash polycythemia via hypoxia-inducible factor-2alpha signaling and splenic erythropoiesis. *J Clin Invest*, *117*(12), 3879-3889. doi:10.1172/JCI32614
- Hildebrandt, M. A., Gu, J., Lin, J., Ye, Y., Tan, W., Tamboli, P., . . . Wu, X. (2010). Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*, *29*(42), 5724-5728. doi:10.1038/onc.2010.305
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*, *71*(22), 6921-6925. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1457
- Holmquist, E., Okroj, M., Nodin, B., Jirstrom, K., & Blom, A. M. (2013). Sushi domain-containing protein 4 (SUSD4) inhibits complement by disrupting the formation of the classical C3 convertase. *FASEB J*, *27*(6), 2355-2366. doi:10.1096/fj.12-222042
- Hon, W. C., Wilson, M. I., Harlos, K., Claridge, T. D., Schofield, C. J., Pugh, C. W., . . . Jones, E. Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature*, *417*(6892), 975-978. doi:10.1038/nature00767
- Horie, S., Aruga, S., Kawamata, H., Okui, N., Kakizoe, T., & Kitamura, T. (1999). Biological role of HGF/MET pathway in renal cell carcinoma. *J Urol*, *161*(3), 990-997.
- Horvitz, H. R., & Sulston, J. E. (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *96*(2), 435-454.
- Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*, *23*(24), 9361-9374.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., & Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(14), 7987-7992.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, *293*(5531), 834-838. doi:10.1126/science.1062961
- Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., & Kaelin, W. G., Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med*, *1*(8), 822-826.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., . . . Kaelin, W. G., Jr. (2001). HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*, *292*(5516), 464-468. doi:10.1126/science.1059817
- Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., . . . Pause, A. (1999). Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(22), 12436-12441.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., . . . Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, *12*(2), 149-162.

- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., . . . Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468-472. doi:10.1126/science.1059796
- Jain, R. K., Au, P., Tam, J., Duda, D. G., & Fukumura, D. (2005). Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol*, 23(7), 821-823. doi:10.1038/nbt0705-821
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., . . . Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635-647. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014
- Jung, M., Mollenkopf, H. J., Grimm, C., Wagner, I., Albrecht, M., Waller, T., . . . Kristiansen, G. (2009). MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med*, 13(9B), 3918-3928. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00705.x
- Kaelin, W. G., Jr. (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer*, 2(9), 673-682. doi:10.1038/nrc885
- Kalmar, A., Peterfia, B., Hollosi, P., Galamb, O., Spisak, S., Wichmann, B., . . . Molnar, B. (2015). DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer. *BMC Cancer*, 15, 736. doi:10.1186/s12885-015-1687-x
- Karakiewicz, P. I., Jeldres, C., Suardi, N., Hutterer, G. C., Perrotte, P., Capitanio, U., . . . Patard, J. J. (2008). Age at diagnosis is a determinant factor of renal cell carcinoma-specific survival in patients treated with nephrectomy. *Can Urol Assoc J*, 2(6), 610-617.
- Karsdorp, N., Elderson, A., Wittebol-Post, D., Hene, R. J., Vos, J., Feldberg, M. A., . . . et al. (1994). Von Hippel-Lindau disease: new strategies in early detection and treatment. *Am J Med*, 97(2), 158-168.
- Kenck, C., Wilhelm, M., Bugert, P., Staehler, G., & Kovacs, G. (1996). Mutation of the VHL gene is associated exclusively with the development of non-papillary renal cell carcinomas. *J Pathol*, 179(2), 157-161. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199606)179:2<157::AID-PATH557>3.0.CO;2-S
- Khella, H. W., Scorilas, A., Mozes, R., Mirham, L., Lianidou, E., Krylov, S. N., . . . Yousef, G. M. (2015). Low expression of miR-126 is a prognostic marker for metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 185(3), 693-703. doi:10.1016/j.ajpath.2014.11.017
- Khoo, S. K., Kahnoski, K., Sugimura, J., Petillo, D., Chen, J., Shockley, K., . . . Teh, B. T. (2003). Inactivation of BHD in sporadic renal tumors. *Cancer Res*, 63(15), 4583-4587.
- Kim, S. N., Lee, G. R., Hwang, E. S., Lee, J. H., Park, S. D., Cho-Chung, Y. S., & Hong, S. H. (1997). Type II protein kinase A up-regulation is sufficient to induce growth inhibition in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 232(2), 469-473. doi:10.1006/bbrc.1997.6313
- Kletscher, B. A., Qian, J., Bostwick, D. G., Andrews, P. E., & Zincke, H. (1995). Prospective analysis of multifocality in renal cell carcinoma: influence of histological pattern, grade, number, size, volume and deoxyribonucleic acid ploidy. *J Urol*, 153(3 Pt 2), 904-906.

- Knowles, H. J., Raval, R. R., Harris, A. L., & Ratcliffe, P. J. (2003). Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res*, *63*(8), 1764-1768.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *68*(4), 820-823.
- Koh, M. Y., & Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci*, *37*(9), 364-372. doi:10.1016/j.tibs.2012.06.004
- Kohno, T., Sekine, T., Tobisu, K., Oshimura, M., & Yokota, J. (1993). Chromosome 3p deletion in a renal cell carcinoma cell line established from a patient with von Hippel-Lindau disease. *Jpn J Clin Oncol*, *23*(4), 226-231.
- Kondo, K., & Kaelin, W. G., Jr. (2001). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res*, *264*(1), 117-125. doi:10.1006/excr.2000.5139
- Kondo, K., Kim, W. Y., Lechpammer, M., & Kaelin, W. G., Jr. (2003). Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol*, *1*(3), E83. doi:10.1371/journal.pbio.0000083
- Kosik, K. S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci*, *7*(12), 911-920. doi:10.1038/nrn2037
- Kotani, A., Ha, D., Schotte, D., den Boer, M. L., Armstrong, S. A., & Lodish, H. F. (2010). A novel mutation in the miR-128b gene reduces miRNA processing and leads to glucocorticoid resistance of MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia cells. *Cell Cycle*, *9*(6), 1037-1042. doi:10.4161/cc.9.6.11011
- Kovacs, G., Soudah, B., & Hoene, E. (1988). Binucleated cells in a human renal cell carcinoma with 34 chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*, *31*(2), 211-215.
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, *42*(Database issue), D68-73. doi:10.1093/nar/gkt1181
- Krzeslak, A., Wojcik-Krowiranda, K., Forma, E., Jozwiak, P., Romanowicz, H., Bienkiewicz, A., & Brys, M. (2012). Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. *Pathol Oncol Res*, *18*(3), 721-728. doi:10.1007/s12253-012-9500-5
- Kurban, G., Duplan, E., Ramlal, N., Hudon, V., Sado, Y., Ninomiya, Y., & Pause, A. (2008). Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2. *Oncogene*, *27*(7), 1004-1012. doi:10.1038/sj.onc.1210709
- Kurban, G., Hudon, V., Duplan, E., Ohh, M., & Pause, A. (2006). Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res*, *66*(3), 1313-1319. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2560
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853-858. doi:10.1126/science.1064921

- Lam, J. S., Leppert, J. T., Belldegrun, A. S., & Figlin, R. A. (2005). Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *World J Urol*, *23*(3), 202-212. doi:10.1007/s00345-004-0466-0
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, *149*(2), 274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017
- Latif, F., Tory, K., Gnarra, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., . . . et al. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, *260*(5112), 1317-1320.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543), 858-862. doi:10.1126/science.1065062
- Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. *Cell*, *116*(2 Suppl), S89-92, 81 p following S96.
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543), 862-864. doi:10.1126/science.1065329
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854.
- Lee, S. T., Feng, M., Wei, Y., Li, Z., Qiao, Y., Guan, P., . . . Yu, Q. (2013). Protein tyrosine phosphatase UBASH3B is overexpressed in triple-negative breast cancer and promotes invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(27), 11121-11126. doi:10.1073/pnas.1300873110
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., . . . Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415-419. doi:10.1038/nature01957
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, *21*(17), 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, *23*(20), 4051-4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, *88*(3), 323-331.
- Li, M., Wang, Y., Song, Y., Bu, R., Yin, B., Fei, X., . . . Wu, B. (2015). MicroRNAs in renal cell carcinoma: a systematic review of clinical implications (Review). *Oncol Rep*, *33*(4), 1571-1578. doi:10.3892/or.2015.3799
- Liang, J., Zhang, Y., Jiang, G., Liu, Z., Xiang, W., Chen, X., . . . Zhao, J. (2013). MiR-138 induces renal carcinoma cell senescence by targeting EZH2 and is downregulated in human clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Res*, *21*(2), 83-91. doi:10.3727/096504013X13775486749218
- Linehan, W. M., & Srinivasan, R. (2013). Targeted therapies: treating advanced kidney cancer-miles to go before we sleep. *Nat Rev Clin Oncol*, *10*(11), 614-615. doi:10.1038/nrclinonc.2013.183

- Linehan, W. M., Srinivasan, R., & Schmidt, L. S. (2010). The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol*, 7(5), 277-285. doi:10.1038/nrurol.2010.47
- Liu, E., Percy, M. J., Amos, C. I., Guan, Y., Shete, S., Stockton, D. W., . . . Prchal, J. T. (2004). The worldwide distribution of the VHL 598C>T mutation indicates a single founding event. *Blood*, 103(5), 1937-1940. doi:10.1182/blood-2003-07-2550
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7), 719-723. doi:10.1038/ncb1274
- Liu, W., Zabirnyk, O., Wang, H., Shiao, Y. H., Nickerson, M. L., Khalil, S., . . . Phang, J. M. (2010). miR-23b targets proline oxidase, a novel tumor suppressor protein in renal cancer. *Oncogene*, 29(35), 4914-4924. doi:10.1038/onc.2010.237
- Liu, X., Ma, L., Rao, Q., Mao, Y., Xin, Y., Xu, H., . . . Wang, X. (2015). MiR-1271 Inhibits Ovarian Cancer Growth by Targeting Cyclin G1. *Med Sci Monit*, 21, 3152-3158.
- Loilome, W., Juntana, S., Namwat, N., Bhudhisawasdi, V., Puapairoj, A., Sripan, B., . . . Yongvanit, P. (2011). PRKAR1A is overexpressed and represents a possible therapeutic target in human cholangiocarcinoma. *Int J Cancer*, 129(1), 34-44. doi:10.1002/ijc.25646
- Lonser, R. R., Glenn, G. M., Walther, M., Chew, E. Y., Libutti, S. K., Linehan, W. M., & Oldfield, E. H. (2003). von Hippel-Lindau disease. *Lancet*, 361(9374), 2059-2067. doi:10.1016/S0140-6736(03)13643-4
- Lou, N., Ruan, A. M., Qiu, B., Bao, L., Xu, Y. C., Zhao, Y., . . . Zhang, X. P. (2017). miR-144-3p as a novel plasma diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol*, 35(1), 36 e37-36 e14. doi:10.1016/j.urolonc.2016.07.012
- Lu, G. J., Dong, Y. Q., Zhang, Q. M., Di, W. Y., Jiao, L. Y., Gao, Q. Z., & Zhang, C. G. (2015). miRNA-221 promotes proliferation, migration and invasion by targeting TIMP2 in renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(5), 5224-5229.
- Lubensky, I. A., Schmidt, L., Zhuang, Z., Weirich, G., Pack, S., Zambrano, N., . . . Zbar, B. (1999). Hereditary and sporadic papillary renal carcinomas with c-met mutations share a distinct morphological phenotype. *Am J Pathol*, 155(2), 517-526. doi:10.1016/S0002-9440(10)65147-4
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654), 95-98. doi:10.1126/science.1090599
- Ma, Q., Peng, Z., Wang, L., Li, Y., Wang, K., Zheng, J., . . . Liu, T. (2016). miR-19a correlates with poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma patients via promoting cell proliferation and suppressing PTEN/SMAD4 expression. *Int J Oncol*, 49(6), 2589-2599. doi:10.3892/ijo.2016.3746
- Macheret, M., & Halazonetis, T. D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol*, 10, 425-448. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040424
- Maher, E. R., Yates, J. R., & Ferguson-Smith, M. A. (1990). Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease, and in sporadic cerebellar haemangioblastoma and renal cell carcinoma. *J Med Genet*, 27(5), 311-314.

- Mathew, L. K., Lee, S. S., Skuli, N., Rao, S., Keith, B., Nathanson, K. L., . . . Simon, M. C. (2014). Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a-3p in clear cell renal cell carcinomas enhances HIF2alpha activity. *Cancer Discov*, *4*(1), 53-60. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0291
- Mavridis, K., Gueugnon, F., Petit-Courty, A., Courty, Y., Barascu, A., Guyetant, S., & Scorilas, A. (2015). The oncomiR miR-197 is a novel prognostic indicator for non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer*, *112*(9), 1527-1535. doi:10.1038/bjc.2015.119
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., . . . Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, *399*(6733), 271-275. doi:10.1038/20459
- McClatchey, A. I., & Yap, A. S. (2012). Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr Opin Cell Biol*, *24*(5), 685-694. doi:10.1016/j.ceb.2012.06.009
- Melo, S. A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G. A., Rossi, S., Spizzo, R., . . . Esteller, M. (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell*, *18*(4), 303-315. doi:10.1016/j.ccr.2010.09.007
- Melvold, R. W., & Sticca, R. P. (2007). Basic and tumor immunology: a review. *Surg Oncol Clin N Am*, *16*(4), 711-735, vii. doi:10.1016/j.soc.2007.08.003
- Merino, M. J., Torres-Cabala, C., Pinto, P., & Linehan, W. M. (2007). The morphologic spectrum of kidney tumors in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol*, *31*(10), 1578-1585. doi:10.1097/PAS.0b013e31804375b8
- Mikhaylova, O., Ignacak, M. L., Barankiewicz, T. J., Harbaugh, S. V., Yi, Y., Maxwell, P. H., . . . Czyzyk-Krzeska, M. F. (2008). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and Egl-9-Type proline hydroxylases regulate the large subunit of RNA polymerase II in response to oxidative stress. *Mol Cell Biol*, *28*(8), 2701-2717. doi:10.1128/MCB.01231-07
- Mikhaylova, O., Stratton, Y., Hall, D., Kellner, E., Ehmer, B., Drew, A. F., . . . Czyzyk-Krzeska, M. F. (2012). VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. *Cancer Cell*, *21*(4), 532-546. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.019
- Min, J. H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W. G., Jr., & Pavletich, N. P. (2002). Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*, *296*(5574), 1886-1889. doi:10.1126/science.1073440
- Mizejewski, G. J. (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med*, *222*(2), 124-138.
- Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E., & Ulbright, T. M. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*, *70*(1), 93-105. doi:10.1016/j.eururo.2016.02.029
- Morris, M. R., & Latif, F. (2016). The epigenetic landscape of renal cancer. *Nat Rev Nephrol*. doi:10.1038/nrneph.2016.168
- Motzer, R. J., Bander, N. H., & Nanus, D. M. (1996). Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, *335*(12), 865-875. doi:10.1056/NEJM199609193351207

- Motzer, R. J., Escudier, B., McDermott, D. F., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., . . . CheckMate, I. (2015). Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 373(19), 1803-1813. doi:10.1056/NEJMoa1510665
- Mukherjee, P., Winter, S. L., & Alexandrow, M. G. (2010). Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 near G1/S is mediated by acute abrogation of prereplication complex activation involving an Rb-MCM interaction. *Mol Cell Biol*, 30(3), 845-856. doi:10.1128/MCB.01152-09
- Muralidhar, B., Winder, D., Murray, M., Palmer, R., Barbosa-Morais, N., Saini, H., . . . Coleman, N. (2011). Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *J Pathol*, 224(4), 496-507. doi:10.1002/path.2898
- Nakada, C., Tsukamoto, Y., Matsuura, K., Nguyen, T. L., Hijiya, N., Uchida, T., . . . Moriyama, M. (2011). Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1alpha, causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *J Pathol*, 224(2), 280-288. doi:10.1002/path.2860
- Neal, C. S., Michael, M. Z., Rawlings, L. H., Van der Hoek, M. B., & Gleadle, J. M. (2010). The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer. *BMC Med*, 8, 64. doi:10.1186/1741-7015-8-64
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., & Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*, 18(5), 1135-1149.
- Neumann, H. P., & Wiestler, O. D. (1994). Von Hippel-Lindau disease: a syndrome providing insights into growth control and tumorigenesis. *Nephrol Dial Transplant*, 9(12), 1832-1833.
- Nguyen, H. C., Yang, H., Fribourgh, J. L., Wolfe, L. S., & Xiong, Y. (2015). Insights into Cullin-RING E3 ubiquitin ligase recruitment: structure of the VHL-EloBC-Cul2 complex. *Structure*, 23(3), 441-449. doi:10.1016/j.str.2014.12.014
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043), 839-843. doi:10.1038/nature03677
- Ohh, M., Yauch, R. L., Lonergan, K. M., Whaley, J. M., Stemmer-Rachamimov, A. O., Louis, D. N., . . . Iliopoulos, O. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell*, 1(7), 959-968.
- Osanto, S., Qin, Y., Buermans, H. P., Berkers, J., Lerut, E., Goeman, J. J., & van Poppel, H. (2012). Genome-wide microRNA expression analysis of clear cell renal cell carcinoma by next generation deep sequencing. *PLoS One*, 7(6), e38298. doi:10.1371/journal.pone.0038298
- Parangi, S., O'Reilly, M., Christofori, G., Holmgren, L., Grosfeld, J., Folkman, J., & Hanahan, D. (1996). Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(5), 2002-2007.

- Park, J. K., Kogure, T., Nuovo, G. J., Jiang, J., He, L., Kim, J. H., . . . Schmittgen, T. D. (2011). miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival. *Cancer Res*, *71*(24), 7608-7616. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1144
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., . . . Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, *408*(6808), 86-89. doi:10.1038/35040556
- Passon, N., Gerometta, A., Puppini, C., Lavarone, E., Puglisi, F., Tell, G., . . . Damante, G. (2012). Expression of Dicer and Drosha in triple-negative breast cancer. *J Clin Pathol*, *65*(4), 320-326. doi:10.1136/jclinpath-2011-200496
- Patel, U., & Sokhi, H. (2012). Imaging in the follow-up of renal cell carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, *198*(6), 1266-1276. doi:10.2214/AJR.11.8381
- Patino-Garcia, A., Zalacain, M., Folio, C., Zanduetta, C., Sierrasesumaga, L., San Julian, M., . . . Lecanda, F. (2009). Profiling of chemo-naïve osteosarcoma and paired-normal cells identifies EBF2 as a mediator of osteoprotegerin inhibition to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Clin Cancer Res*, *15*(16), 5082-5091. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0300
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, *23*(1), 27-47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006
- Polascik, T. J., Cairns, P., Epstein, J. I., Fuzesi, L., Ro, J. Y., Marshall, F. F., . . . Schoenberg, M. (1996). Distal nephron renal tumors: microsatellite allelotyping. *Cancer Res*, *56*(8), 1892-1895.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., & Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, *441*(7092), 437-443. doi:10.1038/nature04871
- Qin, Q., Furong, W., & Baosheng, L. (2014). Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, *33*, 50. doi:10.1186/1756-9966-33-50
- Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J. L., . . . Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*, *25*(13), 5675-5686. doi:10.1128/MCB.25.13.5675-5686.2005
- Redova, M., Poprach, A., Besse, A., Iliev, R., Nekvindova, J., Lakomy, R., . . . Slaby, O. (2013). MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*, *34*(1), 481-491. doi:10.1007/s13277-012-0573-2
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvié, A. E., . . . Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *403*(6772), 901-906. doi:10.1038/35002607
- Ricketts, C., Woodward, E. R., Killick, P., Morris, M. R., Astuti, D., Latif, F., & Maher, E. R. (2008). Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, *100*(17), 1260-1262. doi:10.1093/jnci/djn254
- Rini, B. I., Campbell, S. C., & Escudier, B. (2009). Renal cell carcinoma. *Lancet*, *373*(9669), 1119-1132. doi:10.1016/S0140-6736(09)60229-4

- Roe, J. S., Kim, H., Lee, S. M., Kim, S. T., Cho, E. J., & Youn, H. D. (2006). p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell*, 22(3), 395-405. doi:10.1016/j.molcel.2006.04.006
- Rohan, S. M., Xiao, Y., Liang, Y., Dudas, M. E., Al-Ahmadie, H. A., Fine, S. W., . . . Tickoo, S. K. (2011). Clear-cell papillary renal cell carcinoma: molecular and immunohistochemical analysis with emphasis on the von Hippel-Lindau gene and hypoxia-inducible factor pathway-related proteins. *Mod Pathol*, 24(9), 1207-1220. doi:10.1038/modpathol.2011.80
- Romero-Garcia, S., Moreno-Altamirano, M. M., Prado-Garcia, H., & Sanchez-Garcia, F. J. (2016). Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol*, 7, 52. doi:10.3389/fimmu.2016.00052
- Sakashita, N., Takeya, M., Kishida, T., Stackhouse, T. M., Zbar, B., & Takahashi, K. (1999). Expression of von Hippel-Lindau protein in normal and pathological human tissues. *Histochem J*, 31(2), 133-144.
- Salama, M. F., Carroll, B., Adada, M., Pulkoski-Gross, M., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2015). A novel role of sphingosine kinase-1 in the invasion and angiogenesis of VHL mutant clear cell renal cell carcinoma. *FASEB J*, 29(7), 2803-2813. doi:10.1096/fj.15-270413
- Sandhu, C., & Slingerland, J. (2000). Deregulation of the cell cycle in cancer. *Cancer Detect Prev*, 24(2), 107-118.
- Schodel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Mole, D. R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by CHIP-seq. *Blood*, 117(23), e207-217. doi:10.1182/blood-2010-10-314427
- Schoolmeesters, A., Brown, D. D., & Fedorov, Y. (2012). Kinome-wide functional genomics screen reveals a novel mechanism of TNFalpha-induced nuclear accumulation of the HIF-1alpha transcription factor in cancer cells. *PLoS One*, 7(2), e31270. doi:10.1371/journal.pone.0031270
- Schulte, J. H., Horn, S., Otto, T., Samans, B., Heukamp, L. C., Eilers, U. C., . . . Berwanger, B. (2008). MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer*, 122(3), 699-704. doi:10.1002/ijc.23153
- Semenza, G. L. (2003). Targetting HIF-1 α for cancer therapy. *Nature reviews*, 3(10), 721-732. doi:10.1038/nrc1187
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399-408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021
- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12(12), 5447-5454.
- Sergeyeva, A., Gordeuk, V. R., Tokarev, Y. N., Sokol, L., Prchal, J. F., & Prchal, J. T. (1997). Congenital polycythemia in Chuvashia. *Blood*, 89(6), 2148-2154.

- Sha, J., Xue, W., Dong, B., Pan, J., Wu, X., Li, D., . . . Huang, Y. (2017). PRKAR2B plays an oncogenic role in the castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 8(4), 6114-6129. doi:10.18632/oncotarget.14044
- Shay, J. W., & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 33(5), 787-791. doi:10.1016/S0959-8049(97)00062-2
- Shen, C., Beroukhi, R., Schumacher, S. E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S., & Kaelin, W. G., Jr. (2011). Genetic and functional studies implicate HIF1alpha as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov*, 1(3), 222-235. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0098
- Shinagare, A. B., Vikram, R., Jaffe, C., Akin, O., Kirby, J., Huang, E., . . . Silverman, S. G. (2015). Radiogenomics of clear cell renal cell carcinoma: preliminary findings of The Cancer Genome Atlas-Renal Cell Carcinoma (TCGA-RCC) Imaging Research Group. *Abdom Imaging*, 40(6), 1684-1692. doi:10.1007/s00261-015-0386-z
- Shinojima, T., Oya, M., Takayanagi, A., Mizuno, R., Shimizu, N., & Murai, M. (2007). Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2alpha. *Carcinogenesis*, 28(3), 529-536. doi:10.1093/carcin/bgl143
- Slaby, O., Redova, M., Poprach, A., Nekvindova, J., Iliev, R., Radova, L., . . . Vyzula, R. (2012). Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients. *Genes Chromosomes Cancer*, 51(7), 707-716. doi:10.1002/gcc.21957
- Slack, F. J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*, 5(4), 659-669.
- Society, C. C. (2016). Kidney Cancer Statistics.
- Sporn, M. B. (1996). The war on cancer. *Lancet*, 347(9012), 1377-1381.
- Sudarshan, S., Shanmugasundaram, K., Naylor, S. L., Lin, S., Livi, C. B., O'Neill, C. F., . . . Block, K. (2011). Reduced expression of fumarate hydratase in clear cell renal cancer mediates HIF-2alpha accumulation and promotes migration and invasion. *PLoS One*, 6(6), e21037. doi:10.1371/journal.pone.0021037
- Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, 1(2), 1-4. doi:10.4172/1948-5956.100000e2
- Sutphin, P. D., Chan, D. A., Li, J. M., Turcotte, S., Krieg, A. J., & Giaccia, A. J. (2007). Targeting the loss of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in renal cell carcinoma cells. *Cancer Res*, 67(12), 5896-5905. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0604
- Szabo, Z., Szegedi, K., Gombos, K., Mahua, C., Flasko, T., Harda, K., & Halmos, G. (2016). Expression of miRNA-21 and miRNA-221 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their possible role in the development of ccRCC. *Urol Oncol*, 34(12), 533 e521-533 e527. doi:10.1016/j.urolonc.2016.06.011
- Tang, K., & Xu, H. (2015). Prognostic value of meta-signature miRNAs in renal cell carcinoma: an integrated miRNA expression profiling analysis. *Sci Rep*, 5, 10272. doi:10.1038/srep10272

- Tchernitsa, O., Kasajima, A., Schafer, R., Kuban, R. J., Ungethum, U., Gyorffy, B., . . . Rocken, C. (2010). Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. *J Pathol*, 222(3), 310-319. doi:10.1002/path.2759
- Teplyuk, N. M., Uhlmann, E. J., Gabriely, G., Volfovsky, N., Wang, Y., Teng, J., . . . Krichevsky, A. M. (2016). Therapeutic potential of targeting microRNA-10b in established intracranial glioblastoma: first steps toward the clinic. *EMBO Mol Med*, 8(3), 268-287. doi:10.15252/emmm.201505495
- Thoenes, W., Storkel, S., & Rumpelt, H. J. (1985). Human chromophobe cell renal carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 48(3), 207-217.
- Thoma, C. R., Frew, I. J., Hoerner, C. R., Montani, M., Moch, H., & Krek, W. (2007). pVHL and GSK3beta are components of a primary cilium-maintenance signalling network. *Nat Cell Biol*, 9(5), 588-595. doi:10.1038/ncb1579
- Thomasson, M., Hedman, H., Ljungberg, B., & Henriksson, R. (2012). Gene expression pattern of the epidermal growth factor receptor family and LRIG1 in renal cell carcinoma. *BMC Res Notes*, 5, 216. doi:10.1186/1756-0500-5-216
- Tickoo, S. K., dePeralta-Venturina, M. N., Harik, L. R., Worcester, H. D., Salama, M. E., Young, A. N., . . . Amin, M. B. (2006). Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease: an experience from 66 tumor-bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 30(2), 141-153.
- Tomlinson, I. P., Alam, N. A., Rowan, A. J., Barclay, E., Jaeger, E. E., Kelsell, D., . . . Multiple Leiomyoma, C. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet*, 30(4), 406-410. doi:10.1038/ng849
- Toro, J. R., Wei, M. H., Glenn, G. M., Weinreich, M., Toure, O., Vocke, C., . . . Linehan, W. M. (2008). BHD mutations, clinical and molecular genetic investigations of Birt-Hogg-Dube syndrome: a new series of 50 families and a review of published reports. *J Med Genet*, 45(6), 321-331. doi:10.1136/jmg.2007.054304
- Torrezan, G. T., Ferreira, E. N., Nakahata, A. M., Barros, B. D., Castro, M. T., Correa, B. R., . . . Carraro, D. M. (2014). Recurrent somatic mutation in DRISHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat Commun*, 5, 4039. doi:10.1038/ncomms5039
- Turcotte, S., Chan, D. A., Sutphin, P. D., Hay, M. P., Denny, W. A., & Giaccia, A. J. (2008). A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell*, 14(1), 90-102. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.004
- van Rooijen, E., Voest, E. E., Logister, I., Korving, J., Schwerte, T., Schulte-Merker, S., . . . van Eeden, F. J. (2009). Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia. *Blood*, 113(25), 6449-6460. doi:10.1182/blood-2008-07-167890
- Walz, A. L., Ooms, A., Gadd, S., Gerhard, D. S., Smith, M. A., Guidry Auvil, J. M., . . . Perlman, E. J. (2015). Recurrent DGCR8, DRISHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors. *Cancer Cell*, 27(2), 286-297. doi:10.1016/j.ccell.2015.01.003

- Wang, G., Chen, L., Meng, J., Chen, M., Zhuang, L., & Zhang, L. (2013). Overexpression of microRNA-100 predicts an unfavorable prognosis in renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol*, 45(2), 373-379. doi:10.1007/s11255-012-0374-y
- Wang, X., Li, H., Cui, L., Feng, J., & Fan, Q. (2016). MicroRNA-182 suppresses clear cell renal cell carcinoma migration and invasion by targeting IGF1R. *Neoplasma*, 63(5), 717-725. doi:10.4149/neo_2016_508
- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 269-270.
- Warburg, O. (1956b). [Origin of cancer cells]. *Oncologia*, 9(2), 75-83.
- Wei, L., Cuicui, Z., Jing, W., & Kai, L. (2015). [Antiangiogenic drugs enhance the ability of invasion and metastasis of breast cancer cells under serum starvation and hypoxia]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 37(4), 244-250.
- Welford, S. M., Dorie, M. J., Li, X., Haase, V. H., & Giaccia, A. J. (2010). Renal oxygenation suppresses VHL loss-induced senescence that is caused by increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 30(19), 4595-4603. doi:10.1128/MCB.01618-09
- Wenger, R. H., Stiehl, D. P., & Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, 2005(306), re12. doi:10.1126/stke.3062005re12
- White, N. M., Bao, T. T., Grigull, J., Youssef, Y. M., Girgis, A., Diamandis, M., . . . Yousef, G. M. (2011). miRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation. *J Urol*, 186(3), 1077-1083. doi:10.1016/j.juro.2011.04.110
- WHO. (2004). Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862.
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*, 25(2), 85-101. doi:10.1152/physiol.00045.2009
- Wotschovsky, Z., Liep, J., Meyer, H. A., Jung, M., Wagner, I., Disch, A. C., . . . Jung, K. (2012). Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas. *Int J Biol Sci*, 8(10), 1363-1374. doi:10.7150/ijbs.5106
- Wu, X., Weng, L., Li, X., Guo, C., Pal, S. K., Jin, J. M., . . . Wu, H. (2012). Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis. *PLoS One*, 7(5), e35661. doi:10.1371/journal.pone.0035661
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.
- Xiao, H., Zeng, J., Li, H., Chen, K., Yu, G., Hu, J., . . . Xu, H. (2015). MiR-1 downregulation correlates with poor survival in clear cell renal cell carcinoma where it interferes with cell cycle regulation and metastasis. *Oncotarget*, 6(15), 13201-13215. doi:10.18632/oncotarget.3915

- Xie, L., Xiao, K., Whalen, E. J., Forrester, M. T., Freeman, R. S., Fong, G., . . . Stampler, J. S. (2009). Oxygen-regulated beta(2)-adrenergic receptor hydroxylation by EGLN3 and ubiquitylation by pVHL. *Sci Signal*, 2(78), ra33. doi:10.1126/scisignal.2000444
- Xing, T., & He, H. (2016). Epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and potential use in molecular pathology. *Chin J Cancer Res*, 28(1), 80-91. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.09
- Xiong, F., Liu, K., Zhang, F., Sha, K., Wang, X., Guo, X., & Huang, N. (2016). MiR-204 inhibits the proliferation and invasion of renal cell carcinoma by inhibiting RAB22A expression. *Oncol Rep*, 35(5), 3000-3008. doi:10.3892/or.2016.4624
- Yang, H., Minamishima, Y. A., Yan, Q., Schlisio, S., Ebert, B. L., Zhang, X., . . . Kaelin, W. G., Jr. (2007). pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NF-kappaB agonist Card9 by CK2. *Mol Cell*, 28(1), 15-27. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.010
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17(24), 3011-3016. doi:10.1101/gad.1158803
- Young, A. P., Schlisio, S., Minamishima, Y. A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., . . . Kaelin, W. G., Jr. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol*, 10(3), 361-369. doi:10.1038/ncb1699
- Yusenko, M. V. (2010). Molecular pathology of chromophobe renal cell carcinoma: a review. *Int J Urol*, 17(7), 592-600. doi:10.1111/j.1442-2042.2010.02558.x
- Zaman, M. S., Thamminana, S., Shahryari, V., Chiyomaru, T., Deng, G., Saini, S., . . . Dahiya, R. (2012). Inhibition of PTEN gene expression by oncogenic miR-23b-3p in renal cancer. *PLoS One*, 7(11), e50203. doi:10.1371/journal.pone.0050203
- Zaravinos, A., Pieri, M., Mourmouras, N., Anastasiadou, N., Zouvani, I., Delakas, D., & Deltas, C. (2014). Altered metabolic pathways in clear cell renal cell carcinoma: A meta-analysis and validation study focused on the deregulated genes and their associated networks. *Oncoscience*, 1(2), 117-131. doi:10.18632/oncoscience.13
- Zbar, B., Tory, K., Merino, M., Schmidt, L., Glenn, G., Choyke, P., . . . Linehan, W. M. (1994). Hereditary papillary renal cell carcinoma. *J Urol*, 151(3), 561-566.
- Zeng, Z., Que, T., Zhang, J., & Hu, Y. (2014). A study exploring critical pathways in clear cell renal cell carcinoma. *Exp Ther Med*, 7(1), 121-130. doi:10.3892/etm.2013.1392
- Zhou, H., Zheng, S., Truong, L. D., Ro, J. Y., Ayala, A. G., & Shen, S. S. (2014). Clear cell papillary renal cell carcinoma is the fourth most common histologic type of renal cell carcinoma in 290 consecutive nephrectomies for renal cell carcinoma. *Hum Pathol*, 45(1), 59-64. doi:10.1016/j.humpath.2013.08.004
- Zhu, S., Huang, Y., & Su, X. (2016). Mir-451 Correlates with Prognosis of Renal Cell Carcinoma Patients and Inhibits Cellular Proliferation of Renal Cell Carcinoma. *Med Sci Monit*, 22, 183-190.
- Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., & Bray, F. (2015). International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol*, 67(3), 519-530. doi:10.1016/j.eururo.2014.10.002

