

ARNs NON-CODANTS : POTENTIEL D'UTILISATION THÉRAPEUTIQUE

NON-CODING RNAs: POTENTIAL THERAPEUTIC USE

Par Daniel VAIMAN⁽¹⁾

(Communication présentée le 10 Mars 2016

Manuscrit accepté le 28 Juin 2016)

RÉSUMÉ

Les ARNs non codants constituent une classe d'acides nucléiques de plus en plus étudiée. D'abord pensés comme étant une catégorie anecdotique de produits de la transcription, il apparaît clairement, que sous la forme de petites molécules (micro ARNs -ou miARNs-, siARNs et piARNs) ou de molécules beaucoup plus longues (long-non coding RNA ou lncRNAs), ils jouent un rôle crucial dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes, dans le contexte général de l'interférence à ARN. Des molécules synthétiques mimant leur action peuvent aisément être produites (siARNs ou mimes de miARNs) et vont être capables d'inhiber l'expression des gènes (voire de miARNs naturels). L'intérêt thérapeutique de leur utilisation est donc évident dans quasiment tous les domaines de la médecine. Cette utilisation nécessite tout de même de détruire plusieurs verrous techniques ou technologiques, ce qui est clairement en passe de se produire.

Mots-clés : petits ARNs non codants, épigénétique, expression des gènes, cancer.

ABSTRACT

Non-coding RNAs are a class of nucleic acids increasingly studied. First conceived as an anecdotal product category of the genome transcription, it appears clear that under the form of small molecules (microRNAs -or miRNAs-, siRNAs, piRNAs) or much longer molecules (long non coding RNA or lncRNAs), they play a crucial role in the epigenetic regulation of gene expression, in the context of RNA interference. Synthetic molecules mimicking their action can be easily produced (siRNAs or miRNA mimics) and will be capable of inhibiting the expression of genes (or natural miRNAs). The therapeutic value of their use is evident in virtually all areas of medicine. This use still requires destroying several technical or technological obstacles, which is clearly going to happen.

Key words: small non coding RNAs, epigenetics, gene expression, cancer.

INTRODUCTION

Les progrès de la génomique depuis le premier séquençage du génome humain en 2001 ont montré que la fraction transcrite du génome excédait de façon considérable la seule part due aux gènes. Chez les eucaryotes supérieurs, les gènes représentent en général moins de 1 à 2% du génome. Historiquement, la vision de la recherche génomique moléculaire visant à comprendre l'expression et la régulation du génome a évolué par étapes. Dans les années 1970, des affinements et précisions se sont progressivement accumulés et les dogmes ont petit à

petit perdu leur universalité, avec la découverte des exons, de la part non codante du génome (le *junk* ou *selfish* DNA de Richard Dawkins) ou de la transcriptase inverse. Depuis les années 2000, il est apparu que les introns épissés peuvent coder des petits ARNs qui ont un rôle régulateur et sont capables d'inhiber des gènes cibles soit au niveau de la transcription, soit au niveau de la traduction (Gromak, 2012). Dans les années 1990-2000 les approches de séquençage systématique des transcrits aboutirent à la création de bibliothèques d'ESTs

(1) Institut Cochin U1016 INSERM, UMR8104 CNRS, 24 rue du Faubourg St Jacques, 75014, Paris, France.

Tél. : 01 44 41 23 01

Mail : daniel.vaiman@inserm.fr

(*Expressed Sequence Tags*) et commencèrent à révéler la grande complexité des mécanismes d'épissage alternatifs qui montrent qu'à partir d'un seul gène, on peut en réalité générer des transcrits différents et par voie de conséquence, des protéines différentes, avec des fonctions et des spécificités cellulaires variées. Le développement des approches de séquençage à haut débit (NGS, *Next Generation Sequencing*), à partir des années 2000, révélèrent enfin la vraie richesse du génome transcrit, aboutissant en fait à la conclusion que probablement la plupart des séquences sont transcrites en ARN. En effet, les approches NGS, initialement utilisées exclusivement pour séquencer l'ADN génomique, ont rapidement été utilisées pour évaluer la nature et la quantité des transcrits, via des approches désignée sous le nom de RNA-seq. En dehors des ARNs codant les protéines (ARNs messagers 'classiques'), le bestiaire des ARNs non-codants s'est aujourd'hui incroyablement enrichi. Ces molécules varient considérablement en taille, depuis une vingtaine de nucléotides jusqu'à plusieurs milliers, voire plusieurs centaines de milliers de nucléotides (Mattick, 2001). Certaines de ces molécules sont peut-être de simples sous-produits de la machinerie transcriptionnelle, qui ne gênent pas la biologie de la cellule. L'évolution de mécanismes interdisant absolument la transcription à un niveau de bruit de fond pourrait avoir un rapport coût/bénéfice négatif, un certain 'laisser-aller' transcriptionnel pouvant ainsi être toléré. Certaines de ces molécules d'ARN jouent un rôle indéniable dans la physiologie cellulaire et sont considérées comme des gènes *bona fide*, connus de longue date, tels par exemple le gène *Xist*, acteur majeur de l'inactivation d'un des chromosomes X chez les mammifères placentaires femelles (Avner & Heard, 2001; Heard, 2004) ou encore le gène *H19*, un des gènes soumis à empreinte les plus étudiés (Ripoche *et al.* 1997). Plus récemment, le séquençage à haut débit a révélé l'existence de longs ARNs non codants ou lncRNA (*long noncoding RNA*) de plus de 200 nucléotides, ces molécules sont suspectées jouer un rôle majeur dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes, même si pour le moment, peu d'informations solides sur leur fonction soient disponibles; des travaux très récents révèlent cependant l'existence de peptides codés par certains lncARNs suggérant l'existence de fonctions spécifiques de ceux-ci. Par exemple, le peptide DWORF (*Dwarf Open Reading Frame*), de 34 acides aminés, régule la fonction de la protéine SERCA dans le contexte de la physiologie musculaire et les cardiomyocytes (Nelson *et al.* 2016). Enfin, depuis une quinzaine d'années, il est apparu patent que les cellules eucaryotes contiennent une quantité importante de petits ARNs non codants. Les plus connus sont les microARN ou miRs, dont la taille moyenne avoisine de 21-24 nucléotides, et les siARNs (*small interfering RNAs*). Il est couramment admis que ces derniers sont exogènes, alors que les miARNs sont codés par le génome nucléaire ; parmi les différences, on considère aussi que les siARNs ont une homologie parfaite avec leur ARN messenger cible, alors que cela peut ne pas être le cas avec les miARN (Chu & Rana, 2006). La biogenèse des miARNs et des siARNs a fait l'objet

de plusieurs revues (Krol *et al.* 2010). Parmi les petits ARNs, on trouve encore les piARNs dont la taille moyenne est d'environ 27 nucléotides. Leur biogenèse est réalisée grâce aux protéines PiWi, molécules très conservées dans l'évolution, découvertes initialement chez la drosophile (Cox *et al.* 1998). Les piARNs ont un rôle central dans la gamétogenèse, en particulier dans la spermatogenèse, chez les mammifères. L'appariement chromosomique entre les chromosomes parentaux en méiose constitue un préalable indispensable à la formation des gamètes ; or, les génomes eucaryotes sont emplies de séquences répétées issues de rétrotransposons, séquences qui, si elles sont accessibles, permettraient un appariement anarchique des chromosomes méiotiques ; en effet leur homologie de séquence permet en théorie des appariements entre chromosomes non homologues, ce qui conduit à la mort cellulaire (Shoji *et al.* 2009). Il est donc vital d'inactiver ces séquences avant la méiose, sinon cela induit une catastrophe méiotique et une infertilité totale. Les mutations des gènes impliqués dans cette machinerie induisent donc en général une dysfonction testiculaire totale, comme par exemple dans l'invalidation de *Dnmt3l* chez la souris (Bourc'his *et al.* 2001). Les séquences répétées codant les piARNs évoluent très rapidement et sont peu conservées d'une espèce à l'autre pour la plupart (Chirn *et al.* 2015).

Les micro ARNs, quant à eux, semblent être plus conservés au cours de l'évolution ; certains d'entre eux ont une fonction de régulation développementale conservée chez tous les vertébrés comme miR-9 (Coolen *et al.* 2013). Ce microARN joue un rôle clef dans la régulation de la prolifération des cellules progénitrices neurales, dans la mesure où il est un régulateur direct de gènes clefs de modulation de la transcription dans ces cellules (FoxG1, Hes1, Tlx, Zic5, Elav). Le gène codant MiR-9 est même présent dans tous les organismes triploblastiques étudiés à ce jour (protostomiens et deutérostomiens). Les microARNs peuvent aussi être moins conservés ; par exemple il existe trois clusters de ces petites molécules spécifiques du placenta humain sur les chromosomes 19 (C19MC et MiR-371) et 14 (C14MC), qui sont apparemment absents chez les rongeurs (Morales-Prieto *et al.* 2013). Dans ce texte, nous évoquerons principalement les petits ARNs (siARN et mimes de miARNs) actuellement considérés comme les vecteurs potentiels les plus prometteurs de thérapies dans le court et moyen terme.

LA MACHINERIE CELLULAIRE EN CHARGE DE LA SYNTHÈSE DES PETITS ARNS (miARN ET siARN)

L'idée que des petits ARNs puissent interférer avec l'expression des gènes émergea dans la décennie 1990, avec la découverte des siARNs (*Small Interfering RNAs*). L'effet des siARNs a tout d'abord été découvert chez le pétunia par l'observation d'un phénotype de couleur anormale suite à l'introduction du transgène de la Chalcone Synthétase, CHS (Napoli *et al.* 1990). Cette enzyme était connue comme impliquée dans la synthèse d'anthocyanines, pigments responsables d'une coloration violette chez le pétunia ; les auteurs désiraient surexprimer cette proté-

ine pour induire une coloration foncée dans des fleurs claires. Contrairement à ce qui était prévu, les auteurs observèrent l'apparition de fleurs blanches en quantité. Ce résultat inattendu était associé à une réduction de l'expression de la CHS, cinquante fois plus faible que dans des pétunias non transgéniques. Les auteurs supposèrent donc que l'expression du transgène entraînait une suppression de l'expression du gène endogène. Chez les animaux, un résultat identique fut obtenu par la suite chez *Caenorhabditis elegans* (Guo & Kempfues, 1995). Durant cette période, l'idée d'inhibition de l'expression existait déjà avec l'hypothèse d'ARNs antisens, dont le mode d'action était basé sur l'hybridation avec des ARNs sens (les ARNs messagers codants). Cependant, des expériences ultérieures montrèrent que des molécules ARNs double brin étaient incomparablement plus efficaces pour inhiber des gènes cibles que des molécules simple brin (Fire *et al.* 1998), peut être en raison de leur ressemblance avec le matériel génétique des virus à ARN. Le principe général de l'inactivation de gènes cellulaires par les petits ARNs fait simplement appel aux propriétés d'hybridation.

En 1999, ce type d'effet d'inactivation de gènes a été assigné à de petites molécules d'ARNs (<25 nucléotides) toujours présentes dans les mécanismes de silencing post-transcriptionnel d'abord chez les plantes (Hamilton & Baulcombe, 1999). Des petites molécules double brin sont en fait fabriquées par le génome de toutes les espèces eucaryotes. Elles peuvent, une fois rendues simple brin, cibler des ARN messagers et soit induire leur destruction, soit inhiber la traduction à partir de ces matrices. Un très bon résumé des mécanismes est présenté dans une vidéo du journal Nature (disponible à <https://www.youtube.com/watch?v=cK-OGB1-ELE>). L'homologie de séquence à la base du ciblage repose en général sur peu de bases (7 à 9, le *seed*), ce qui implique qu'*a priori* ces mécanismes d'interférence à l'ARN (au sens large, l'ensemble des mécanismes par lequel des molécules d'ARN peuvent inhiber l'expression des gènes)

peuvent viser plusieurs gènes simultanément. En effet, des séquences de sept à neuf bases se rencontrent statistiquement sur plus d'un gène et donc l'hybridation avec le petit ARN interférent peut se produire avec plusieurs ARN messagers différents. Les petits ARNs constituent donc un mode de régulation épigénétique permettant à la cellule de viser éventuellement plusieurs gènes d'une cascade métabolique et ainsi l'inhiber (si les gènes partagent dans leur séquence la même cible homologue du *seed*) influant ainsi sur la physiologie cellulaire et le développement. En bref, les miARN sont codés par le génome, soit à partir de gènes, soit en tant que sous-produits d'introns de gènes hôtes. Les mécanismes en œuvre sont résumés dans de nombreuses revues de la littérature et font intervenir une série de protéines nucléaires et cytoplasmiques (Drosha/Pasha, Exportin5, Dicer, Argonaute, etc.) (Ghildiyal & Zamore 2009).

INTÉRÊT MÉDICAL DES PETITS ARN

Les miRNA comme biomarqueurs

Une des applications les plus importantes des petits ARNs (en particulier des micro ARNs) consiste à les considérer comme des biomarqueurs, que l'on peut quantifier dans des tissus, mais surtout dans différents fluides biologiques (plasma, urine, liquide céphalo-rachidien, etc.). L'utilisation des miRNA comme biomarqueurs a été envisagée pour les maladies cardiaques et cérébro-vasculaires (Li *et al.* 2015), pour de nombreux cancers (Fu *et al.* 2016), pour l'endométriose (Mari-Alexandre *et al.* 2015), la prééclampsie (Jairajpuri & Almawi, 2016), la maladie de Crohn (Moret *et al.* 2013), les infections virales (Kitab *et al.* 2015), et cette liste n'est en aucun cas exhaustive. Quelques exemples d'essais cliniques sont donnés dans le **tableau 1**, adapté de (Ku *et al.* 2015). En fait, On peut

Cible	Pathologie	Phase	Statut
KRAS	Tumeur pancréatique	I	Terminée
P53	Dysfonction rénale aiguë	I	Terminée
PKN3	Tumeurs solides avancées	I	Terminée
KRT6A	Pachyonychie congénitale	I	Terminée
VEGF	Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)	I/II	Terminée
EPHA2	Cancers avancés	I/II	Recrutement prévu
RRM2	Tumeurs solides	I	Arrêté
PKL1	Métastases hépatiques	I	Terminée
APOB	Hypercholestérolémie	I	Arrêté
VEGF, KSP	Tumeurs solides	I	Terminée
HIF1	Métastases hépatiques	I	Terminée
PTP-801	Néovascularisation choroidale, œdème maculaire lié au diabète	II	Terminée
VEGF	DMLA	III	Retiré

Tableau 1 : Ce tableau récapitule les essais cliniques réalisés à l'aide de petits ARNs interférents, avec le gène cible visé pour être dégradé spécifiquement par le petit ARN. Il existe actuellement de très nombreuses revues sur le sujet ; celle qui a été choisie est celle de Ku *et al.* (2015). Ce tableau n'est pas exhaustif, car il existe de nombreuses initiatives privées telles celle de miRNA therapeutics qui a en phase I un test d'un liposome contenant un mime de miR34, pour traiter des carcinomes rénaux, acaux et hépatocellulaires.

supposer qu'aucune pathologie n'échappe à une dérégulation de l'expression des petits ARNs, sans pour autant qu'ils aient systématiquement un impact causal dans celles-ci.

Cet engouement pour cette famille de marqueurs va au-delà de la mode, car il est fortement supporté par des considérations objectives : la réalité des modifications du niveau de ces molécules dans les liquides biologiques, la relative facilité technique permettant de les quantifier, la connaissance théorique ou validée des ARN messagers cible d'un miARN déterminé, et enfin, la possibilité éventuelle de les utiliser comme outils thérapeutiques.

Un des préliminaires nécessaires peut être d'identifier de prime abord les anomalies éventuelles de profils de petits ARNs. Pour ce faire, plusieurs approches techniques sont envisageables (Pritchard *et al.* 2012), basée sur l'analyse de puces d'expression générales ou dédiées et de PCR quantitative spécifique mais leur description technique ne sera pas détaillée ici. Les autres approches sont basées sur le séquençage à haut-débit des ARNs, nécessaire pour avoir non seulement un détection du petit ARN, mais également son niveau d'expression, la différence entre les patients et les témoins étant souvent quantitative. Ces approches permettent en outre de détecter de nouveaux miARNs mais la technique de choix pour la quantification absolue par des miRNA demeure la PCR quantitative.

Ces méthodes ont montré que certains miARN circulants sont des marqueurs relativement univoques de maladies ; par exemple, miR-141, exprimé dans les cancers de la prostate, se retrouve à des niveaux élevés dans le plasma des patients avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 60%, étant en moyenne surexprimé 46 fois dans les patients par rapport au groupe témoin (Mitchell *et al.* 2008). Une combinaison des niveaux de miARNs sériques peut permettre d'obtenir des spécificité et des sensibilités encore meilleures, comme dans les cas de crise cardiaque (Goren *et al.* 2012).

Le traitement par des petits ARNs

Quand un miARN est détecté comme variable lors d'une maladie, on peut en théorie envisager de l'utiliser comme outil thérapeutique, c'est-à-dire utiliser une molécule ARN double brin similaire au miR endogène. On peut aussi utiliser de la même façon des petits ARNs synthétiques capables de cibler un ARN donné et ainsi de bloquer la production d'une protéine. Réciproquement, il est possible de synthétiser des molécules de type antagomir qui vont cibler des miARN et induire leur destruction, activant potentiellement la synthèse de protéines originellement cible des miARNs, en contrecarrant leur destruction normale. De plus certains miARNs ont eux-mêmes une activité oncogénique, d'où l'intérêt de les cibler par des antagomirs qui vont induire leur dégradation et peut-être restreindre ou ralentir le processus cancéreux. Un des problèmes majeurs est celui de la voie d'administration et du ciblage du petit ARN médicament. En effet, les acides

nucléiques, chargés négativement, n'ont pas de propension à pénétrer dans les cellules. Une des solutions utilisée dans des modèles précliniques est l'utilisation de liposomes cationiques. On propose aussi des nanoparticules (polymères) ou à noyau métallique, des dendrimères (molécules de forme ramifiée) et des micelles polymériques. Un des problèmes est de concentrer les siARNs et pour cela, on peut exploiter leur charge négative en les couplant à des polycations. Parmi les possibilités récemment développées, des nanoparticules à base d'ARN ou d'ADN existent maintenant, telles les *nanorings* d'ARN, susceptibles d'être chargés en siARNs (Afonin *et al.* 2012). Un tétramère d'ADN peut être construit avec des sommets présentant une complémentarité avec une extrémité libre et linéaire des siARN (Lee *et al.* 2012). Ces particules semblent présenter de très bonnes qualités pharmacologiques. Une très bonne discussion des ces modes d'administration est donnée dans la récente revue de Ku et collègues (Ku *et al.* 2015).

À côté des promesses évidentes de la voie thérapeutique potentielle fournie par les petits ARNs, et en dehors des problèmes spécifiques liés à l'administration des molécules, les projets d'extinction ciblée de gènes se heurtent à de nombreuses difficultés. Trois sont particulièrement étudiées : l'extinction de cibles non désirées (*off-target silencing*), l'activation de la réponse immunitaire, et la stabilité des petits ARNs.

Les siARN eux-mêmes peuvent être dégradés dans le sérum et les tissus, avec au mieux une demi-vie d'une heure (Behlke, 2006). Certaines approches sont proposées pour induire des modifications chimiques permettant la stabilisation de ces molécules (Dar *et al.* 2015). Une partie de ces modifications est clairement explicitée dans la récente revue de Ku (Ku *et al.* 2015).

La diminution du *off-target*, la possibilité qu'un siRNA se 'trompe' de cible a aussi été approchée par des modifications chimiques des siARNs, ainsi que par des particularités structurales. Sans être exhaustif, et en raison du recul encore relativement faible sur ces sujets, des études montrent qu'un mésappariement présent vers le 3' du siARN tend à limiter ses effets (Hohjoh, 2004).

L'activation de la réponse immunitaire est relativement limitée avec des petits ARNs double brin, car on considère que la réponse antivirale liée à l'interféron est activée plutôt à partir de molécules d'une taille excédant les 30 nucléotides. Par exemple, une étude récente montre que l'injection systémique de siRNA attachés à des conjugués polyéthylèneimine/ transferrine-polyéthylèneimine, n'induit pas la réponse interféron. L'injection de siARNs peut néanmoins aboutir à une toxicité et à une activation de cette voie (Reynolds *et al.* 2006), peut être par l'intermédiaire du récepteur TLR7 (Wieser *et al.* 2005). Cette question de l'activation de la voie interféron est donc intimement corrélée à la méthode d'apport des siARNs.

NOUVELLES QUESTIONS & CONCLUSION

Depuis la découverte de l'interférence à ARN dans les années 1990, plus de 50000 articles de recherche ont été publiés sur le sujet. En fait, beaucoup plus de publications scientifiques utilisent l'interférence à ARN pour des recherches fondamentales sur la fonction des gènes. L'utilisation de siARN dans les modèles cellulaires, ainsi que dans les modèles animaux, est une voie royale et relativement peu chère permettant d'analyser finement la fonction d'un gène déterminé et son intercalation dans des voies métaboliques. La découverte de systèmes d'interférences à ARN naturels, extrêmement répandus dans le monde vivant, a constitué une étape supplémentaire dans l'échafaudage de notre compréhension actuelle des systèmes biologiques. Cette étape se complique maintenant considérablement par l'identification de très nombreux ARNs non codants longs, dont l'étude fonctionnelle est encore balbutiante. Il est néanmoins vraisemblable que ces molécules de plus de 200 bases et parfois, de plusieurs dizaines de milliers de bases, peuvent réguler l'expression des gènes de plusieurs façons différentes. Leur structure secondaire peut constituer une structure tridimensionnelle dans laquelle des micro ARNs vont être piégés et protégés jusqu'à leur action (éponge à micro ARNs). Ils peuvent préparer la chromatine à des interactions directes avec des variants d'histones déterminés. Il est inté-

ressant de noter que dans la situation particulière des gènes soumis à empreinte parentale, souvent organisés en 'clusters' le long des chromosomes, on découvre dans la plupart des cas l'existence d'un ARN anti-sens non codant, qui pourrait jouer un rôle clef dans l'extinction d'un allèle et pas de l'autre. De façon intéressante aussi, il est maintenant vraisemblable que les phénomènes inattendus d'héritabilité transgénérationnelle puissent être associés à l'accumulation de petits ARNs dans les gamètes de parents exposés, comme dans le cas des mécanismes de paramutation, qui induisent l'apparition de proportions non mendéliennes dans la descendance (Rassoulzadegan *et al.* 2006; Kiani *et al.* 2013; Rodgers *et al.* 2015). Il est probable que les petits ARNs soient les acteurs de programmations métaboliques et comportementales sur parfois plus de deux générations (Anway *et al.* 2005).

En conclusion, il semble très vraisemblable que les petits ARNs thérapeutiques vont constituer dans l'avenir un important outil supplémentaire à la pharmacopée existante, en dépit des limitations existant actuellement. C'est un secteur de recherche très dynamique qui anime des équipes entières, une indication de l'intérêt présenté pour ce sujet dans le monde académique, médical et industriel.

BIBLIOGRAPHIE

- Afonin KA, Kireeva M, Grabow WW, Kashlev M, Jaeger L, Shapiro BA. Co-transcriptional assembly of chemically modified RNA nanoparticles functionalized with siRNAs. *Nano Lett.* 2012;12(10): 5192-5.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005; 308(5727): 1466-9.
- Avner P & Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2001; 2(1): 59-67.
- Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther.* 2006;13(4): 644-70.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001;294(5551): 2536-9.
- Chirn GW, Rahman R, Sytnikova YA, Matts JA, Zeng M, Gerlach D *et al.* Conserved piRNA Expression from a Distinct Set of piRNA Cluster Loci in Eutherian Mammals. *PLoS Genet.* 2015; 11(11): e1005652.
- Chu C Y & Rana TM. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* 2006; 4(7): e210.
- Coolen M, Katz S, Bally-Cuif L. miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *Front Cell Neurosci.* 2013;7: 220.
- Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 1998;12(23): 3715-27.
- Dar GH, Gopal V, Rao M. Systemic delivery of stable siRNA-encapsulating lipid vesicles: optimization, biodistribution, and tumor suppression." *Mol Pharm.* 2015; 12(2): 610-20.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669): 806-11.
- Fu SW, Lee W, Coffey C, Lean A, Wu X, Tan X *et al.* miRNAs as potential biomarkers in early breast cancer detection following mammography. *Cell Biosci.* 2016;6: 6.
- Ghildiyal M & Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 2009;10(2): 94-108.
- Goren Y, Kushnir M, Zafir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012; 14(2): 147-54.
- Gromak N. Intronic microRNAs: a cross-road in gene regulation. *Biochem Soc Trans* 2012;40(4): 759-61.
- Guo S & Kemphues KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995;81(4): 611-20.
- Hamilton AJ & Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999;286(5441): 950-2.
- Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(3): 247-55.
- Hohjoh H. Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS Lett.* 2004;557(1-3): 193-8.
- Jairajpuri DS & Almawi WY. MicroRNA expression pattern in pre-eclampsia (Review). *Mol Med Rep.* 2016;13(3):2351-8. doi:10.3892/mmr.2016.4846. Epub 2016 Feb 2.
- Kiani J, Grandjean J, Liebers R, Tuorto F, Ghanbarian H, Lyko F *et al.* RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genet.* 2013;9(5): e1003498.
- Kitab B, Alj HS, Ezzikouri S, Benjelloun S. MicroRNAs as Important Players in Host-hepatitis B Virus Interactions. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(2): 149-61.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9): 597-610.
- Ku SH, Jo SD, Lee YK, Kim K, Kim SH. Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; doi: 10.1016/j.addr.2015.10.015.
- Lee H, Lytton-Jean AK, Chen Y, Love KT, Park AI, Karagiannis ED *et al.* Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(6): 389-93.
- Li H, Fan J, Yin Z, Wang F, Chen C, Wang DW. Identification of cardiac-related circulating microRNA profile in human chronic heart failure. *Oncotarget* 2016;7(1): 33-45.
- Mari-Alexandre J, Garcia-Oms J, Barcelo-Molina M, Gilabert-Aguilar J, Estelleés A, Braza-Boils A, Gilabert-Estelleés J. MicroRNAs and angiogenesis in endometriosis. *Thromb Res.* 2015;135 Suppl 1: S38-40.
- Mattick JS. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* 2001; 2(11): 986-91.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(30): 10513-8.
- Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Schoenleben M, Markert UR. Pregnancy-associated miRNA-clusters. *J Reprod Immunol.* 2013;97(1): 51-61.
- Moret I, Sanchez-Izquierdo D, Iborra M, Tortosa L, Navarro-Puche A, Nos P *et al.* Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS One* 2013;8(12): e82753.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990;2(4): 279-289.
- Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, Winders BR, Troupes CD, Wu F *et al.* A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science* 2016;351(6270): 271-5.
- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5): 35 8-69.
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006;441(7092): 469-74.
- Reynolds A, Anderson EM, Vermeulen A, Fedorov Y, Robinson K, Leake D *et al.* Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA.* 2006;12(6): 988-93.
- Ripoche MA, Kress C, Poirier F, Dandolo L. Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes Dev.* 1997;11(12): 1596-604.
- Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, Bale TL. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(44): 13699-704.
- Shoji M, Tanaka T, Hosokawa M, Reuter M, Stark A, Kato Y *et al.* The TDRD9-MIW12 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell* 2009;17(6): 775-87.
- Wieser F, Vigne JL, Wenzl R, Huber J, Taylor RN. Sulindac suppresses nuclear factor-kappaB activation and RANTES gene and protein expression in endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12): 6441-7.