

Projet ANR :

Analyse multi-omiques de la maladie
chronique rénale chez des souris

PRETET Maël

11 janvier 2021

1.	INTRODUCTION	3
2.	CONTEXTE, POSITIONNEMENT ET OBJECTIF DU PROJET	4
2.1	OBJECTIFS DU PROJET	4
2.2	ÉTAT DE L'ART	4
2.3	ORIGINALITE DU PROJET	5
3.	ORGANISATION ET MISE EN ŒUVRE DU PROJET	5
3.1	METHODOLOGIE	5
3.2	RESULTATS ATTENDUS	7
3.3	IMPACT DU PROJET	8
4.	CALENDRIER ET BUDGET	9
4.1	CALENDRIER	9
4.2	BUDGET	9
5.	REFERENCES	10

1. Introduction

La maladie chronique rénale (Chronic Kidney Disease en anglais, qui sera abrégée en CKD par la suite) est une pathologie portée par 697,5 millions de personnes en 2017, et ayant causé la mort de 1,2 millions de personnes la même année. Cette maladie possède cependant une répartition mondiale très disparate : en effet, si l'on reprend les chiffres de 2017, il est observable que la Chine et l'Inde présentent respectivement 132,3 et 115,1 millions d'individus touchés par la CKD, et que dix pays (Bangladesh, Brésil, Indonésie, Japon, Mexique, Nigeria, Pakistan, Russie, États-Unis et Vietnam) en comportent plus de 10 millions.

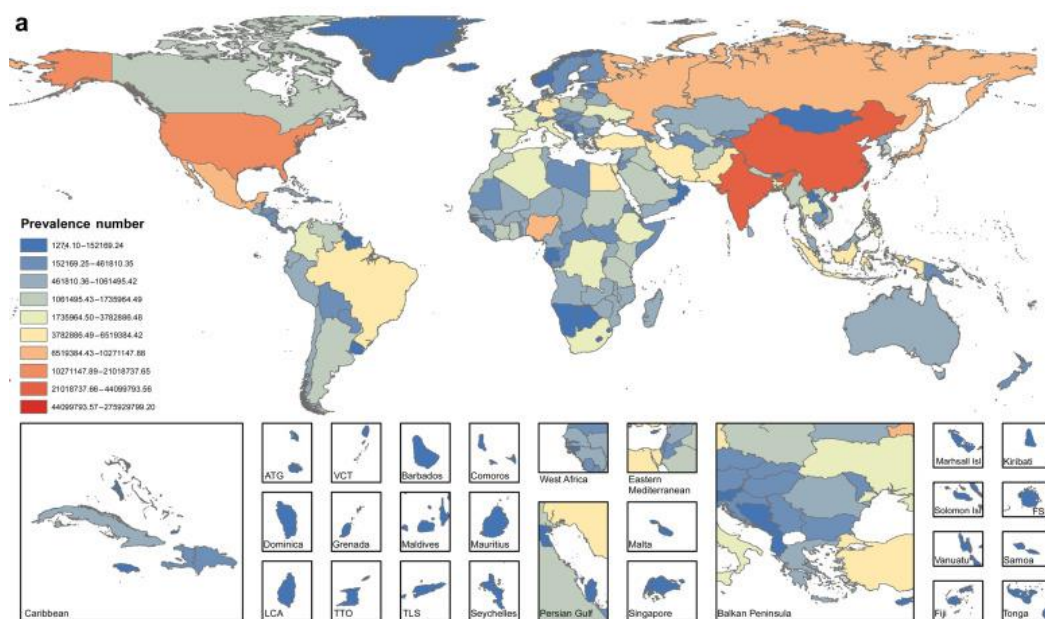


Figure 1 : Prévalence mondiale de la CKD en 2016, source : [2]

Les CKD peuvent être souvent liées à d'autres maladies ou problèmes de santé¹, créant une pression sur les reins. On peut citer notamment le diabète, l'hypertension artérielle ou un taux élevé de cholestérol. On parle ici de CKD à étiologie connue, mise en opposition aux CKD à étiologie inconnue (CKDu).

5 stades de la CKD sont actuellement définis chez l'humain, en fonction du débit de filtration glomérulaire. Lorsque les patients possèdent un débit trop faible, il est nécessaire de les placer sous dialyse, ou d'envisager une transplantation rénale.

¹ <https://www.nhs.uk/conditions/kidney-disease/>

2. Contexte, positionnement et objectif du projet

2.1 Objectifs du projet

L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de la CKD sur différentes composantes omiques de la souris à travers les prismes suivantes : métagénomique, transcriptomique du rein et phénotypique.

Cette étude s'inscrit dans la continuité d'une étude précédente, publiée en 2020 [5], établissant une corrélation entre la composition de l'eau de puits situés dans différentes régions du Sri Lanka et la prévalence de CKD centralisée autour de ces puits. Celle-ci établissait notamment la composition du microbiome de ces puits, puisque des études précédentes montraient des différences significatives de la composition du microbiote intestinal entre des témoins sains et des patients atteints de CKD. L'objectif était donc de retrouver des compositions similaires entre l'eau de ces puits et le microbiote des patients.

Les analyses citées s'appuient sur des données prélevées chez les humains. Cependant, le projet présenté ici choisit de se reposer sur l'étude de trois groupes de souris. En effet, les données transcriptomiques semblent ici plus aisées à recueillir chez un panel de souris que chez des humains. De plus, trois groupes de souris sont mentionnées précédemment. Le premier sera composé de souris témoins, le second de souris ayant subi un traitement provoquant la CKD, et le dernier de souris alimentées avec une eau ayant la même composition que celle indiquée dans l'étude au Sri Lanka citée précédemment.

2.2 État de l'art

La caractérisation des OTU d'un microbiote est aujourd'hui un processus connu et courant dans la recherche, avec l'augmentation de la qualité des séquenceurs (on peut citer ceux fabriqués par Illumina) tant en termes de vitesse de séquençage qu'en fiabilité des données. Ainsi, de nombreuses études ont pu mettre en évidence les différences significatives de la composition du microbiote chez des patients atteints de CKD et des patients sains. Les mêmes informations citées précédemment peuvent être reportées quant aux études transcriptomiques, mettant en lumière des différences significatives d'expression entre des patients CKD et témoins.

Un article d'octobre 2020 s'est lui basé sur la relation entre la composition de l'eau consommée par des personnes et la présence de CKD parmi cette population. Effectuée à Medawachchiya au Sri Lanka, cette étude a ainsi mis en évidence la corrélation entre l'enrichissement en micro-organismes et en composés chimiques de l'eau avec la prévalence de CKD à l'intérieur de la population la consommant. Ainsi est posée l'interrogation de la causalité entre ces deux facteurs, et de la modification

possible du microbiote des individus exposés à la consommation sur une longue durée d'une eau ne répondant pas aux normes sanitaires de l'OMS.

Le projet présenté se base sur une étude multi-omiques appliquée à des souris ayant subi un traitement provoquant la CKD chez ses organismes. De nombreuses études sur la CKD utilisent des modèles murins et proposent différentes solutions pour induire la maladie chez ces souris. Ici, on choisira de reprendre un protocole déjà proposé par un article induisant la CKD avec une alimentation dont la composition en nutriments a été modifiée.

Enfin, l'analyse multi-omiques sera réalisée avec un package R nommé mixOmics, un projet collaboratif implémentant des fonctions liées à des méthodes multivariées, permettant d'analyser plusieurs données omiques simultanément, et d'établir des indices de covariance permettant de mettre en évidence les relations entre différentes unités de plans dissimilaires.

2.3 Originalité du projet

L'originalité de ce projet est double. D'une part, l'objectif est d'approfondir l'impact de la consommation d'eau ne correspondant pas à certaines normes sanitaires sur le développement de la CKD. En effet, dans l'étude au Sri Lanka citée précédemment [5], la corrélation entre la présence des puits et le développement de CKD avait été établie. Ce projet cherchera donc à cibler l'impact de cette consommation sur des souris, ce qui efface certains facteurs sociaux ou environnementaux supplémentaires.

De plus, le second objectif est d'apporter sur la CKD un point de vue multi-omiques, pour aller au-delà des précédentes études se concentrant principalement sur une composante simple omique. Il est alors permis d'avoir une vision plus globale sur la problématique, avec potentiellement une analyse de la covariance entre les différentes composantes, et la compréhension plus avancée de la maladie.

3. Organisation et mise en œuvre du projet

3.1 Méthodologie

On choisit d'étudier 32 souris C57BL/6 pour chaque groupe, pour un total de 96 souris. Celles-ci seront isolées et leur régime alimentaire sera modifié à partir de la 8^{ème} semaine de leur développement. Toutes les souris sont isolées dans des cages individuelles pour éviter l'homogénéisation du microbiote lorsque plusieurs souris sont élevées dans une même cage. On prévoit donc des cages de 12 cm de hauteur et de 80 cm² au sol au minimum, pour pouvoir élever des souris de 30g maximum [19].

Les souris du groupe 1 seront nourries avec un régime et une eau standard (témoin). Celles du groupe 2 seront nourries avec un régime connu pour induire la CKD chez les souris [14] comportant notamment 0.2% d'adénine et 0.8% de

phosphore (CKDi pour CKD induit). Enfin, le groupe 3 nécessitera le même régime alimentaire que les souris du groupe 1, mais l'eau qui lui sera attribuée aura une composition modifiée et similaire à celle prélevée lors de l'étude au Sri Lanka [5] (CKDh pour CKD hypothétique). On notera un taux de fluor élevé, ainsi que la présence des genres *Leptospira*, *Microcystis* et *Turicibacter*.

Dans un premier temps, les laboratoires présents sur place seront contactés pour envisager la congélation et l'envoi d'échantillons de ces puits. Étant donné le manque d'informations quant à cette possibilité, est envisagée en priorité la solution de reproduire en laboratoire l'enrichissement de l'eau selon les niveaux déterminés dans le tableau 1.

Les souris seront élevées pendant 20 semaines. Au dernier jour, leur poids, taille et une mesure du débit de filtration glomérulaire sont relevés. Les sels sont également relevés pour analyse du microbiote intestinal. Les souris sont ensuite sacrifiées pour les études transcriptomiques du rein (extraction des ARNm à partir du rein).

Il est ensuite nécessaire d'effectuer un séquençage 16S pour déterminer une table d'OTU pour chaque souris, ainsi qu'un séquençage des ARNm du rein pour établir le niveau d'expression des transcrits. On prévoit environ 110 échantillons pour le séquençage 16S et le séquençage des ARNm (on prévoit une marge d'erreur possible sur les échantillons). La longueur de read est estimée à 150 paires de bases, en format paired-end, et avec une profondeur de 30-50 millions pour la métagénomique et environ 5 millions pour la transcriptomique.

Tableau 1 : Tableaux résumant la composition chimique et du microbiome de l'eau prélevée lors de l'étude au Sri Lanka en 2020 [5], tirés de ce même article

Parameter	WHO health-based limit ³⁵	This study (n = 30)					
		Sri Lanka standard 614: 2013 ³⁶ limit	Min	Median	Average	Max	Standard deviation
As (mg L ⁻¹)	0.010	0.010	0.005	0.005	0.005	0.005	<0.005
Ba (mg L ⁻¹)	0.700	–	0.033	0.200	0.234	0.597	0.156
Ca (mg L ⁻¹)	–	100.0	8.3	71.7	74.1	140.0 ^a	30.3
Cl (mg L ⁻¹)	–	250.0	17.7	65.4	97.5	310.0 ^b	80.8
Cr (mg L ⁻¹)	0.050	0.050	0.001	0.001	0.001	0.002	<0.001
Cu (mg L ⁻¹)	2.000	1.000	0.001	0.001	0.001	0.002	<0.001
F (mg L ⁻¹)	1.50	1.00	0.07	1.11	1.24	3.70 ^c	0.74
K (mg L ⁻¹)	–	–	0.6	1.4	3.5	54.0	9.6
Mg (mg L ⁻¹)	–	30.0	5.6	33.9	39.7	95.2 ^d	19.9
Na (mg L ⁻¹)	–	200.0	10.9	33.9	82.3	234.0 ^e	19.9
Ni (mg L ⁻¹)	0.070	0.020	0.001	0.002	0.003	0.008	0.002
NO ₃ (mg L ⁻¹)	50.0	50.0	0.5	0.5	1.9	12.4	3.1
P (mg L ⁻¹)	–	–	0.01	0.01	0.05	0.24	0.07
U (mg L ⁻¹)	0.030	–	0.001	0.001	0.001	0.006	0.001
Zn (mg L ⁻¹)	–	3.000	0.001	0.002	0.003	0.008	0.002

Table 1. World Health Organization (WHO) and Sri Lanka drinking water standard 614:2013 guideline values for inorganic water chemistry parameter limits in drinking water compared against values observed in this study. For the purposes of this assessment, samples falling below the limit of detection have been assigned a value equal to the limit of detection. ^a4 of 30 samples exceed the SLSI guideline value. ^b3 of 30 samples exceed the SLSI guideline value. ^c17 of 30 samples exceed the SLSI guideline value, 9 of 30 samples exceed the WHO guideline value. ^d21 of 30 samples exceed the SLSI guideline value. ^e1 of 30 samples exceed the SLSI guideline value.

	OTU level	Total abundance for all water samples (%)	Counts			
			Average	Minimum	Maximum	σ
Verrucomicrobia	Phylum	4.82	10,727	913	41,624	10,378
Gammaproteobacteria	Class	32.48	124,678	37,282	237,360	56,297
Enterobacteriaceae	Family	0.01	30	0	229	49
Microcystis	Genus	0.40	885	0	22,187	4193
Leptospira	Genus	0.01	21	0	217	48
Clostridium sensu stricto	Genus	0.24	542	18	4482	1097
Desulfovibrio	Genus	0.03	73	0	1243	239
Holdemania	Genus	3.05×10^{-4}	1	0	12	2
Turicibacter	Genus	0.05	103	0	2272	429
Methylobacterium	Genus	3.12	6936	237	36,431	7878

Table 2. Total abundance of bacteria for all samples shown as a percentage of the total microbial count in all samples, operational taxonomic unit (OTU) level and sample average, minimum, maximum and standard deviations values of microbial counts of microbes in water samples from this study. Table shows the current study's results for microbes previously identified³⁷⁻³⁹ in higher concentrations in CKD compared to healthy individuals.

Une fois les données prélevées, l'extraction des données de métagénomique sera effectuée via le pipeline qiime [21], pour déterminer notamment la table d'OTU, ainsi que les diversités alpha et bêta. L'analyse en simple omique de ces données se basera donc sur ces résultats dans un premier temps, ainsi que sur une analyse via test PERMANOVA.

Les analyses transcriptomiques seront également effectuées via ce test, mais également par détermination d'enrichissement selon les groupes et tests statistiques de comparaison selon le type de traitement des données.

Il est en dernier lieu proposé, sur les composantes simple-omiques, d'effectuer une analyse en composante principale sur les jeux de données pour permettre de comprendre la variance existant dans les modèles présentés.

Les analyses multi-omiques seront réalisées avec l'aide du package mixOmics. Dans un premier temps, le test choisi est un test de "Projection on Latent Structures" (PLS), qui permet de maximiser la covariance entre deux jeux de données, et ainsi étudier la covariance entre les niveaux d'expression des ARNm et les différents OTU établis.

Enfin, il peut aussi être intéressant de réaliser un test "PLS with Discriminant Analysis" (PLS-DA), supervisés selon le débit de filtration calculé. Celui-ci est disponible en données quantitatives, mais pourrait être étudié en termes de données qualitatives, en séparant les données en différents groupes selon l'intervalle du débit (ce qui se rapprocherait d'une donnée qualitative "état du rein").

3.2 Résultats attendus

Concernant la composante métagénomique, il est attendu de retrouver des résultats similaires à ceux présentés lors de précédentes études, à savoir une différence significative de la composition du microbiote entre le groupe sain et le

groupe CKDi. Cependant, à cela s'ajoute le groupe CKDh. Il sera intéressant sur ce groupe d'étudier la similarité ou les différences notables du microbiote, puisque celui-ci n'a pas été détaillé lors de précédentes analyses. L'hypothèse de départ est de retrouver un microbiote plus proche du groupe CKDi que le groupe témoin.

Les mêmes attentes sont présentes pour la composante transcriptomique. En effet, la dégradation du rein est attendue comme ayant un impact sur les données recueillies, une nouvelle fois comme vu dans des études antérieures, avec un rapprochement du groupe CKDh avec le groupe CKDi.

Si ces résultats ne sont pas avérés, il sera alors nécessaire de se pencher en détail sur les données pour évaluer la distance existante entre celles-ci (on pourra notamment penser à des algorithmes de clustering). En effet, la CKD étant une maladie complexe, il est tout à fait possible de retrouver une composition du microbiote et une expression des ARNm très différente entre les groupes CKDi et CKDh. Il faudra donc orienter les analyses comme une comparaison de deux groupes par rapport au témoin dans un premier temps, pour rapprocher les deux groupes ayant subi un traitement particulier ensuite.

Pour la partie multi-omique de ce projet, les analyses devront se concentrer sur les matrices de covariance calculées, pour évaluer notamment la présence de certains OTU par rapport au niveau d'expression des ARNm. Il est espéré d'observer la présence de certaines espèces bactériennes ayant des relations de covariance avec la sur- ou sous-expression de certains ARNm. Si ces premières études peuvent s'avérer positives, il est proposé de cibler ces ARNm pour approfondir une étude fonctionnelle par exemple.

3.3 Impact du projet

Le projet présenté ici a pour objectif d'obtenir une meilleure compréhension de la CKD, pour hypothétiquement approfondir des objectifs médicaux d'une part, et pour permettre d'accroître la connaissance vis-à-vis du microbiote et des relations que son évolution peut avoir avec d'autres composantes multi-omiques. En effet, une grande partie des approches effectuées sur la métagénomique ces dernières années se concentrent principalement sur cette composante uniquement. Le développement des outils d'analyse multi-omiques a permis à cette vision plus globale de prendre de l'importance dans le domaine de la recherche. Il est ainsi possible d'approfondir le champ des connaissances en étudiant de façon plus détaillée l'interaction que les différentes omiques peuvent établir entre elles.

De plus, cette étude fait également suite à une précédente citée de nombreuses fois au cours de ce rapport. En effet, la connaissance de l'impact de la consommation d'eau polluée sur l'organisme pourra de surcroît être analysée. Il est évident nécessaire d'avoir du recul par rapport à cette étude et le projet proposé : la première mettait en

évidence la corrélation entre la présence de puits contaminés et le développement de la CKD chez les humains, tandis que le second transpose ces contraintes chez la souris. Ainsi, l'objectif sera avant tout ici d'essayer de faire apparaître un impact significatif et quantifié de cette consommation d'eau uniquement sur le développement de cette pathologie, avec éventuellement une proposition de concentration sur d'autres zones où des relevés similaires pourraient être faits pour prévenir l'apparition de la CKD.

4. Calendrier et budget

4.1 Calendrier

Tableau 2 : Calendrier prévisionnel des étapes au cours des différents semestres

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ÉLEVAGE DES RATS												
PRÉLÈVEMENTS + SEQUENÇAGE												
ANALYSE DES DONNÉES												
RÉSULTATS												

4.2 Budget

Tableau 3 : Tableau récapitulatif du budget demandé en termes de personnel

Budget associé au personnel				
Type de personnel	Nombre d'intervenants	Temps d'intervention (en mois)	Coût total (en €)	Budget demandé
Directeur de recherche	1	36	326 000	0
Expérimentateur	1	9	40 000	0
Doctorant	1	36	127 000	127 000
Stagiaire	2	12	6500	6500
Biostatisticien	1	18	100 000	0
			Total	133 500

Tableau 4 : Budget demandé en termes de matériels

Équipements, animaux et matériels	Coût (en €)
Souris (achat et élevage)	15 000
Débit de filtration	10 000
Métagénomique	200 000
Transcriptomique	200 000
Total	425 000

Le budget total demandé pour cette étude est de 1 024 500€. Le salaire d'une partie des membres du personnel étant couvert par le laboratoire, le financement demandé est donc de 558 500€.

5. Références

1. Xie Y, Bowe B, Mokdad AH, et al. Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016. *Kidney Int.* 2018;94(3):567-581. doi:10.1016/j.kint.2018.04.011
2. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2020;395:709-733. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30045-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30045-3)
3. Almaguer M, Herrera R, Orantes CM. Chronic kidney disease of unknown etiology in agricultural communities. *MEDICC Rev.* 2014;16(2):9-15. <https://doi.org/10.37757/MR2014.V16.N2.3>
4. Weaver, V.M., Fadrowski, J.J. & Jaar, B.G. Global dimensions of chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu): a modern era environmental and/or occupational nephropathy. *BMC Nephrol* 16, 145 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0105-6>
5. McDonough, L.K., Meredith, K.T., Nikagolla, C. et al. The water chemistry and microbiome of household wells in Medawachchiya, Sri Lanka, an area with high prevalence of chronic kidney disease of unknown origin (CKDu). *Sci Rep* 10, 18295 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75336-7>
6. Schultz, M.B., Kane, A.E., Mitchell, S.J. et al. Age and life expectancy clocks based on machine learning analysis of mouse frailty. *Nat Commun* 11, 4618 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18446-0>
7. Valentina Volynets, Sandrine Louis, Dominik Pretz, Lisa Lang, Maureen J Ostaff, Jan Wehkamp, Stephan C Bischoff, Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose, *The Journal of Nutrition*, Volume

8. Walker, S.P., Barrett, M., Hogan, G. et al. Non-specific amplification of human DNA is a major challenge for 16S rRNA gene sequence analysis. *Sci Rep* 10, 16356 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73403-7>
9. Wijetunge S, Ratnatunga NV, Abeysekera TD, Wazil AW, Selvarajah M. Endemic chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka: Correlation of pathology with clinical stages. *Indian J Nephrol.* 2015 Sep-Oct;25(5):274-80. <https://doi.org/10.4103/0971-4065.145095>
10. Li, F., Wang, M., Wang, J., Li, R. & Zhang, Y. Alterations to the gut microbiota and their correlation with inflammatory factors in chronic kidney disease. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 9, 206–206. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00206> (2019)
11. Vaziri, N. D. et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int.* 83, 308–315. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.345> (2013)
12. Canadas-Garre, M. et al. Genetic susceptibility to chronic kidney disease — some more pieces for the heritability puzzle. *Front. Genet.* 10, 453 (2019). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00453>
13. Andrew Scott Terker, Mark de Caestecker. Modeling human disease: a mouse model of acute kidney injury to chronic kidney disease progression after cardiac arrest, *Kidney International*, Volume 97, Issue 1, 2020, Pages 22-24, ISSN 0085-2538, <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.09.017>
14. Tani T, Fujiwara M, Orimo H, et al. Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improved survival probability in the CKD-MBD mouse model. *J Pathol* 2020; 250: 30– 41. <https://doi.org/10.1002/path.5346>
15. C. Pietrement, L. Gorisse, S. Jaisson, P. Gillery Chronic increase of urea leads to carbamylated proteins accumulation in tissues in a mouse model of CKD *PloS One*, 8 (2013), p. e82506 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082506>
16. Masaya Baba, Mutsuo Furihata, Seung-Beom Hong, Lino Tessarollo, Diana C. Haines, Eileen Southon, Vishal Patel, Peter Igarashi, W. Gregory Alvord, Robert Leighty, Masahiro Yao, Marcelino Bernardo, Lilia Ileva, Peter Choyke, Michelle B. Warren, Berton Zbar, W. Marston Linehan, Laura S. Schmidt, Kidney-Targeted Birt-Hogg-Dubé Gene Inactivation in a Mouse Model: Erk1/2 and Akt-mTOR Activation, Cell Hyperproliferation, and Polycystic Kidneys, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 100, Issue 2, 16 January 2008, Pages 140–154, <https://doi.org/10.1093/jnci/djm288>
17. Singh, S.K., Malik, A., Firoz, A. et al. CDKD: a clinical database of kidney diseases. *BMC Nephrol* 13, 23 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2369-13-23>

18. Lin, H., Peddada, S.D. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun* 11, 3514 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>
19. Journal officiel des Communautés européennes : Directive du conseil du 24 novembre 1986 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (86/906/CEE)
20. R Correa-Rotter, C Wesseling, RJ Johnson CKD of unknown origin in Central America: the case for a Mesoamerican nephropathy *Am J Kidney Dis*, 63 (2014), pp. 506-520 [https://www.ajkd.org/article/S0272-6386\(13\)01568-0/fulltext](https://www.ajkd.org/article/S0272-6386(13)01568-0/fulltext)
21. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, J Gregory Caporaso, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D Bushman, Elizabeth K Costello, Noah Fierer, Antonio Gonzalez Pena, Julia K Goodrich, Jeffrey I Gordon, Gavin A Huttenhower, Scott T Kelley, Dan Knights, Jeremy E Koenig, Ruth E Ley, Catherine A Lozupone, Daniel McDonald, Brian D Muegge, Meg Pirrung, Jens Reeder, Joel R Sevinsky, Peter J Turnbaugh, William A Walters, Jeremy Widmann, Tanya Yatsunenko, Jesse Zaneveld and Rob Knight; *Nature Methods*, 2010; doi:10.1038/nmeth.f.303
22. Ferenc Tajti, Christoph Kuppe, Asier Antoranz, Mahmoud M. Ibrahim, Hyojin Kim, Francesco Ceccarelli, Christian H. Holland, Hannes Olauson, Jürgen Floege, Leonidas G. Alexopoulos, Rafael Kramann, Julio Saez-Rodriguez, A Functional Landscape of CKD Entities From Public Transcriptomic Data, *Kidney International Reports*, Volume 5, Issue 2, 2020, Pages 211-224, ISSN 2468-0249, <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2019.11.005>.
23. Kim-Anh Le Cao, Florian Rohart, Ignacio Gonzalez, Sebastien Dejean with key contributors Benoit Gautier, Francois Bartolo, contributions from Pierre Monget, Jeff Coquery, FangZou Yao and Benoit Liqueur. (2016). *mixOmics: Omics Data Integration Project*. R package version 6.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=mixOmics>