



HAL
open science

Contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du récepteur minéralocorticoïde par les variations de tonicité extracellulaire : conséquences physiopathologiques.

Ingrid Lema

► To cite this version:

Ingrid Lema. Contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du récepteur minéralocorticoïde par les variations de tonicité extracellulaire : conséquences physiopathologiques.. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS290 . tel-03381206

HAL Id: tel-03381206

<https://theses.hal.science/tel-03381206>

Submitted on 16 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS290

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 568
Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie

Spécialité de doctorat : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Madame Ingrid LEMA

Titre de la thèse :

Contrôle Post-Transcriptionnel de l'Expression Rénale du
Récepteur Minéralocorticoïde par les Variations de tonicité extracellulaire :
Conséquences Physiopathologiques

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre, le 14 Octobre 2016 :

Composition du Jury :

Monsieur DUSSAULE Jean-Claude, PUPH, Université Pierre et Marie Curie
Monsieur AUBOEUF Didier, DR1 Inserm, Ecole Normale Supérieure de Lyon
Monsieur CRAMBERT Gilles, CR1 Inserm, Université Pierre et Marie Curie
Madame AMAR Laurence, CR1 CNRS, Université Paris Sud
Monsieur LOMBES Marc, DR1 Inserm, Université Paris Sud
Monsieur VIENGCHAREUN Say, IR1 Inserm, Université Paris Sud

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de Thèse
Co-Directeur de Thèse

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 568
Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie

Spécialité de doctorat : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Madame Ingrid LEMA

Titre de la thèse :

Contrôle Post-Transcriptionnel de l'Expression Rénale du
Récepteur Minéralocorticoïde par les Variations de tonicité extracellulaire :
Conséquences Physiopathologiques

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre, le 14 Octobre 2016 :

Composition du Jury :

Monsieur DUSSAULE Jean-Claude, PUPH, Université Pierre et Marie Curie
Monsieur AUBOEUF Didier, DR1 Inserm, Ecole Normale Supérieure de Lyon
Monsieur CRAMBERT Gilles, CR1 Inserm, Université Pierre et Marie Curie
Madame AMAR Laurence, CR1 CNRS, Université Paris Sud
Monsieur LOMBES Marc, DR1 Inserm, Université Paris Sud
Monsieur VIENGCHAREUN Say, IR1 Inserm, Université Paris Sud

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directeur de Thèse
Co-Directeur de Thèse

*« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas,
c' est parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles ».*

Sénèque

*Il n'y a que deux façons de vivre sa vie :
l'une en faisant comme si rien n'était un miracle,
l'autre en faisant comme si tout était un miracle.*

Albert Einstein

Remerciements

Je voudrais premièrement remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Jean-Claude Dussaule pour l'honneur que vous me faites de l'avoir accepté de présider ce jury.

Madame le Docteur Laurence Amar pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de l'être l'examinatrice.

Monsieur le Docteur Didier Auboeuf pour avoir eu la gentillesse de juger ce travail depuis le mi-parcours de thèse, pour vos conseils avisés sur mon projet doctoral qui nous a permis d'avancer dans une nouvelle direction.

Monsieur le Docteur Gilles Crambert pour avoir été là pour m'encadrer lors de ma première immersion dans le monde de la recherche, tous mes remerciements pour avoir été présent à la conclusion de mes années d'études avec la réalisation de ce doctorat. Merci pour tous vos conseils et votre bienveillance.

A mes directeurs de thèse :

Je ne sais pas vraiment par où commencer mais je tenais tout d'abord à vous remercier pour tout : sans vous cette thèse n'aurait pas pu être réalisée. Merci d'avoir constitué un tandem de choc pour m'encadrer tout au long de ces cinq années mais encore plus pour m'avoir fait confiance avec ce projet et lors de nombreux congrès internationaux.

Marc,

Cela m'a pris quelques années pour enfin arrêter de te vouvoyer et te connaître mieux. Un énorme merci d'avoir toujours cru pour moi même lors de mes périodes de doutes quand le projet n'avancait pas comme espéré. Merci pour tes conseils, tes encouragements, ta gentillesse, ton humour et surtout pour ta disponibilité au quotidien. Tu es une personne que je respecte énormément et qui a toujours su me guider dans la bonne direction. Je n'oublierai jamais si l'ambiance générale de l'unité est ce qu'elle est c'est en grande partie grâce à toi et à la cohésion d'équipe que tu as su fédérer autour de toi.

Say,

Que dire ! Merci de m'avoir choisie pour faire un master parmi les autres candidats. Pour toujours prendre le temps de me poser des millions de questions et de prendre soin de moi comme un autre père. Même si parfois je ne te le montre pas, tu es une personne que j'estime et que j'apprécie énormément au quotidien, encore merci pour tout, pour ta rigueur scientifique, pour m'avoir poussée à me dépasser. Je te serai toujours reconnaissante de m'avoir accordé ta confiance sur le projet que tu avais initié et de m'avoir confié le soin des KC3. Je garde le reste pour la dédicace et le jour de la soutenance en espérant ne pas devenir trop émotive.

Aux collègues et collaborateurs avec lesquels j'ai eu l'opportunité de travailler :

Larbi,

On se ressemble beaucoup trop ce qui peut parfois être effrayant car j'espère toujours changer un de ses quatre. Merci pour tout d'avoir toujours le mot pour me faire rire, me faire relativiser par rapport au monde impitoyable de la recherche scientifique, les discussions foot et autres. Mais au-delà de ça, merci pour ta disponibilité, ta bienveillance et ton aide sans limite, c'est tellement rare de nos jours !

Nadia,

Je tiens à te remercier pour ton immense participation à ce projet, tes idées, les discussions et ton esprit critique qui ont grandement contribué à la grande qualité de ce travail de thèse. Merci d'avoir toujours eu le temps pour ce projet malgré tes nombreux projets et pour ta gentillesse.

Jérôme F,

Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer en détails les subtilités structurales du MR, d'avoir toujours un moment pour répondre à mes questions et mes soucis informatiques avec mon ordinateur plus que capricieux

Laetitia,

Je suis contente d'avoir eu l'opportunité de travailler avec toi sur un projet commun. Je te remercie pour ta gentillesse, ta bonne humeur et de faire en sorte que le bureau ne devienne pas trop rempli de testostérone

Claudine Cosson,

Merci d'avoir toujours quelques heures à me consacrer pour la réalisation des innombrables dosages urinaires, de m'avoir aidée avec les millions de compresses du projet PREMALDO. Ce furent des moments mémorables.

Eric Pussard,

Je te remercie de m'avoir formée à la réalisation des dosages R.I.A et pour ta disponibilité.

Anne Blanchard,

Je vous remercie, pour votre aide et vos conseils sur le projet et le challenge de la démonstration *in vivo* de nos résultats.

Je tiens également à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont posé les bases de ce projet scientifique passionnant : Vixra, Mélanie S, Thi-An,

Aux collègues devenus amis :

Nadège C.,

Tu es et tu resteras ma « méchante préférée » et je reste ton disciple petit scarabée je sais que au cours de ces dernières années nous n'avons pas autant pu nous voir que j'espérais mais sois assurée de l'affection et de l'amitié que je te porte !

Justyne,

Ton rire me manque au quotidien, merci de toujours garder le sourire et d'avoir toujours 5 minutes à m'accorder ! Depuis que tu travailles de l'autre côté des Alpes, c'est parfois dur d'arriver à organiser des sorties avec les filles. Tu es une fille au top, je suis contente de te compter parmi mes amis proches.

Valérie,

Ma « co-thésarde préférée », bon tu as un peu cassé la promesse que ton sœur avait faite de finir ensemble mais, je te l'accorde, tu as les plus belles des raisons ! Merci pour ton amitié, tu fais partie d'une des plus belles rencontres que j'ai faites au sein de l'unité !

Anne-Lise,

Je me sens seule dans notre passion commune depuis que tu es partie ! Je suis devenue trop sage, maintenant plus de craquage ! Je te remercie pour ta disponibilité, pour tes encouragements et d'avoir toujours les bons mots pour me rassurer, tu es une copine au top !

Charlotte,

La fille la plus débordée que je connaisse ! mais qui sait tout gérer d'une main de maître (il faudra me dire ton secret). Merci d'être toujours là avec le sourire pour discuter pour une pause thé ou goûter. Vivement que ton arrivée à accorder nos emplois du temps pour passer un super moment ensemble !

Ségo,

La plus cool de toute ! Celle qui parcourt le monde, va à des concerts top et prends toujours le temps pour ses amis ! Merci d'avoir été là pour me permettre de me détendre lors de goûters, pauses ciné ou dans le super bar au pied de ton appart.

Emmanuelle,

Merci pour ta disponibilité, tes conseils, ton rire facile et ta gentillesse. J'espère que nous continuerons de nous voir avec les filles autour de nombreux goûters et autres supers moments !

A mes supers collègues de bureaux :

Stéphanie,

Ma nouvelle voisine de bureau ! Cela fait déjà un petit moment maintenant en réalité. Je te remercie de m'aider à voir le verre à moitié plein quand je suis au bord de la dépression à cause des manips !

Jérôme N. alias « Dr Oreille »,

Bon je l'avoue je me ennuie des millions d'€5v à changer ! Merci d'avoir toujours le mot pour me faire rire, de venir en pyjama de chirurgien au labo et de faire des associations de couleurs comme toi seul arrive à le faire ! Il a eu une tentative de remplacement avec la version 2.0 mais les trop nombreux bugs nous font préférer l'original !

Damien,

Je ne pensais pas rencontrer MacGuyver en arrivant dans le labo mais ce fut une agréable surprise ! Merci pour ta disponibilité, d'accepter d'être mon bouc émissaire et de toujours m'accorder 5 minutes pour répondre aux questions, résoudre mes problèmes de réseaux informatiques mais surtout pour tes millions d'anecdotes sur d'innombrables domaines.

Aux membres de l'unité U1185 :

Nadine,

Je te remercie pour ton aide précieuse lors de la préparation aux différents congrès auxquels j'ai pu participer. Merci pour l'accueil au sein de ton labo lorsque je suis venue occuper la paillasse de Justine et pour mon intégration au repas de la « Binart's team » de temps en temps !

Isabelle,

Merci pour tes conseils avisés surtout lors de cette dernière ligne droite mais également pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Françoise,

Ma première connaissance à Villejuif, je te remercie d'être un peu « la maman » du labo pour nous les étudiants. Merci d'être toujours disponible pour rendre un service, prendre des nouvelles et occuper des KC3.

Mohsen,

Tu vois, je ne t'ai pas oublié ! Merci pour ton oreille attentive, ta gentillesse et tes millions de déclarations de « libanais lovers » qui me font mourir de rire. Je te remercie également de toujours être partant pour organiser un petit « event » au sein de l'unité.

Florian,

Ca y est tu es le prochain sur la liste ! Mais je ne m'inquiète pas pour cela je sais que tu vas assurer comme un pro ! Merci d'être toujours joyeux, d'avoir toujours 5 minutes pour discuter de tout et de rien sur de nombreux domaines.

Mirella et Vianney,

Je ne sais pas si je dois vous remercier de me « piquer » mon chef au quotidien ! Mais je vous remercie pour votre enthousiasme communicatif et le temps que vous prenez pour l'organisation de moments mémorables entre les « jeunes du labo » !

Sophie et Nelly,

Les nouvelles copines, merci pour votre bonne humeur quotidienne, les rires ! Sophie merci d'être l'autre fille du labo à soutenir le PSG, je me sens moins seule ! Nelly, enfin une fille qui assiste à plus de mariage que moi !

Christophe,

Un petit mot pour le « bébé » de l'unité (désolée c'était trop tentant), c'est agréable de rencontrer quelqu'un de profondément gentil et toujours prêt à rendre service. Surtout ne change pas en vieillissant.

Claudia,

Merci d'avoir toujours été cool et gentille avec moi !

A tous les autres membres actuels ou anciens de l'unité U1185 que je n'ai pas personnellement cités, je vous remercie pour votre sympathie et votre aide au quotidien, car c'est grâce à vous que le labo est ce qu'il est !

A mes amis :

Nadège J., Marion et Dahbia,

Mes trois supers copines de master ! Déjà 5 ans et c'est comme au premier jour ! Je vous remercie pour l'amitié sans limite, les restos, les fous-rires (rien qu'on y repensant je suis pliée en quatre !) Je souhaite que l'on continue longtemps à planifier des week-ends de folie, à se voir, à échanger bref que cela reste comme c'est entre nous pour toujours ! Je vais m'arrêter là mais j'espère que vous savez l'affection que j'ai pour vous.

Mon super Groupe d'étude,
Merci pour les fous-rires, les rebondissements mais surtout pour ce merveilleux temps d'étude dans les Ecritures, je voudrais qu'on continue cela encore très longtemps !

Zazie,
Merci d'avoir toujours la Parole appropriée, d'avoir été un réel soutien durant ma dernière année.

Eunice L,
Ma « coupine de poulet », une merveilleuse rencontre, c'est fou à quel point on se comprend, merci de faire partie de mon entourage proche et d'être là au quotidien. Je serai là pour le jour J qui se profile à l'horizon et pour le reste !

Admirat,
Mon « Chef Mentor Modèle », je ne pouvais pas ne pas te mentionner dans ma thèse ! Merci d'être une super amie, de continuer à m'encourager et à me soutenir malgré la distance. La plus belle des chansons hein !!

A tous ceux que je n'ai pas cités, je vous porte dans mon cœur et vous remercie sincèrement pour votre amitié, j'espère en rester digne.

A ma famille :

A mes parents,
Tout simplement merci pour votre amour, vos sacrifices, vos encouragements, votre aide, cet accomplissement universitaire est également le vôtre ! J'espère continuer à vous rendre fiers.

A mes sœurs,
Merci pour tout, chacune à sa façon m'apporte énormément, je ne vous échangerai pour rien au monde !

A mes oncles, mes tantes et le reste de la famille,
Je ne peux pas citer les noms car cela serait trop long, mais je me dois de vous adresser quelques mots, merci pour vos encouragements, votre soutien ; soyez rassuré de la tendre et profonde affection que j'ai pour vous.

A la maisonnée,
Merci pour votre appui sans faille, je suis bénie de faire partie de cette merveilleuse famille !

A D.,

Je ne saurais comment te remercier, pour ton aide et ton soutien sans faille, mais je sais que cette réussite est la tienne assurément ! Merci de me rendre capable de déplacer des montagnes !

Publications présentées dans cette thèse

Article 1

Hypertonicity compromises renal mineralocorticoid receptor signaling through Tis11b-mediated posttranscriptional control.

Ingrid Lema*, Say Viengchareun*, Khadija Lamribet, Vixra Kéo, Anne Blanchard, Nadia Cherradi, Marc Lombès.

J Am Soc of Nephrol. 2014 Oct;25(10):2213-21.

**Ces auteurs ont contribué de façon équivalente*

Article 2

RNA Binding Protein HuR Splices and Stabilizes Mineralocorticoid Receptor Transcript Under Hypotonicity Enhancing Renal Mineralocorticoid Signaling.

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard, Marc Lombès*, Nadia Cherradi*, Say Viengchareun*.

Manuscrit soumis

**Ces auteurs ont contribué de façon équivalente*

Publications présentées en Annexe

Article 3

Glucocorticoids stimulate endolymphatic water reabsorption in inner ear through aquaporin 3 regulation.

Jérôme Nevoux, Say Viengchareun, **Ingrid Lema**, Anne-Lise Lecoq, Evelyne Ferrary, Marc Lombès.

Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. 2015, 467, 1931. 1943.

Article 4

Aldosterone-signaling defect exacerbates sodium wasting in very preterm neonates: The Premaldo Study.

Laétitia Martinerie, Eric Pussard, Nadia Yousef, Claudine Cosson, **Ingrid Lema**, Khaled Hussein, Sébastien Mur, Marc Lombès*, Pascal Boileau*. (*Co-derniers auteurs)

J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015, 100, 4074. 4081.

Communications Orales

2015

Potential of Renal Aldosterone Responsiveness via Hypotonicity-Induced Mineralocorticoid Receptor Expression by the RNA Binding Protein HuR

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard, Marc Lombès, Nadia Cherradi, Say Viengchareun

97th Endocrine Society Annual Meeting, San Diego, 05-08 Mars 2015.

Enhancement of Renal Aldosterone Responsiveness via Hypotonicity-Induced Mineralocorticoid Receptor Expression by the RNA Binding Protein HuR

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard, Marc Lombès, Nadia Cherradi, Say Viengchareun

FEBS ALC, Island of Spetses, August 23-28

2014

L'hypotonie extracellulaire stimule l'expression rénale du Récepteur Minéralocorticoïde et augmente la réponse à l'aldostérone.

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard, Marc Lombès, Nadia Cherradi, Say Viengchareun

31ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Lyon, 05-08 Novembre 2014.

Hypotonicity triggers rapid HuR nuclear export, increases Mineralocorticoid Receptor mRNA stability and potentiates renal Aldosterone responsiveness.

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard, Marc Lombès, Nadia Cherradi, Say Viengchareun

Admire Cost Annual Meeting 2014, Italy, Padua, 16 - 17 Octobre 2014

New Facets of the Posttranscriptional Control of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard, Marc Lombès, Nadia Cherradi, Say Viengchareun

4th Nuclear Receptors Symposium, Strasbourg, 23 Mai 2014.

2013

Contrôle Post-Transcriptionnel de l'Expression Rénale du Récepteur Minéralocorticoïde par l'Hypertonie: Conséquences Physiopathologiques sur la balance hydro-électrolytique

Ingrid Lema, Say Viengchareun, Vixra Kéo, Larbi Amazit, Jérôme Nevoux, Laétitia Martinerie, Anne Blanchard, Nadia Cherradi, Marc Lombès

30ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Paris, 02-05 Octobre 2013.

Price for the best Oral communication

Hypertonicity Induced Renal Tis11b Mediates Posttranscriptional Control of Mineralocorticoid Receptor Signaling

Say Viengchareun, **Ingrid Lema**, Khadija Lamribet, Vixra Kéo, Anne Blanchard, Nadia Cherradi, Marc Lombès

3ème Journée de Récepteurs Nucléaires, Toulouse, 11 Octobre 2013

The RNA Binding Protein Tis11b Post-Transcriptionally Controls Renal Mineralocorticoid Receptor Expression by Accelerating its Hypertonicity-Induced mRNA Degradation.

Say Viengchareun, **Ingrid Lema**, Vixra Kéo, Larbi Amazit, Jérôme Nevoux, Laetitia Martinerie, Nadia Cherradi, Marc Lombès.

39th Meeting of the International Aldosterone Conference, San Francisco, 13-14 Juin 2013.

2012

Post-Transcriptional Control of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression by the RNA Binding Proteins Tis11b and HuR Under Osmotic Stress.

Say Viengchareun, **Ingrid Lema**, Larbi Amazit, Vixra Kéo, Jérôme Nevoux, Nadia Cherradi, Marc Lombès.

Meeting of the European Section of Aldosterone Council (ESAC), Hannovre, 23-24 Novembre 2012

Communications sous forme de poster

2015

Potential of Renal Aldosterone Responsiveness via Hypotonicity-Induced Mineralocorticoid Receptor Expression by the RNA Binding Protein HuR

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard, Marc Lombès, Nadia Cherradi, Say Viengchareun

Journée de l'École doctorale ED419, 07 janvier 2015. Prix du meilleur poster

Hypotonicity-induced HuR subcellular trafficking potentiates renal aldosterone responsiveness via mineralocorticoid Receptor mRNA stabilization

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard, Marc Lombès, Nadia Cherradi, Say Viengchareun.

FEBS ALC, Island of Spetses, August 23-28

2013

Renal Mineralocorticoid Receptor Expression is Regulated by Tis11b-Mediated Post-Transcriptional Control: Pathophysiological Implications.

Say Viengchareun, **Ingrid Lema**, Vixra Kéo, Larbi Amazit, Jérôme Nevoux, Laetitia Martinerie, Nadia Cherradi, Marc Lombès.

Endocrine Society Meeting, 15-18 Juin 2013

Poster

Table des matières

Tables des illustrations	1
Liste des abréviations	3
Avant propos	5
INTRODUCTION	7
1. Homéostasie du sodium dans le rein	7
1.1. Rappel de physiologie rénale	7
1.2. Organisation structurale rénale	8
1.2.1. Architecture rénale	8
1.2.2. Le néphron.....	8
1.3. Le gradient corticopapillaire	9
1.4. Réabsorption de sodium et régulation de la pression artérielle	10
1.4.1. Réabsorption de sodium dans le néphron	10
1.4.2. Contrôle rénal de la pression artérielle	13
1.5. Réabsorption de sodium dans le néphron distal sensible à l'aldostérone	14
1.6. Réabsorption d'eau dans le néphron distal.....	14
2. L'aldostérone et le Récepteur Minéralocorticoïde	16
2.1. Biosynthèse de l'aldostérone	16
2.1.1. Présentation de la surrénale humaine.....	16
2.1.2. Biosynthèse de l'aldostérone	17
2.2. Régulation de la sécrétion d'aldostérone	18
2.2.1. Le système rénine-angiotensine-aldostérone.....	19
2.2.2. Le potassium	20
2.2.3. L'ACTH (Adreno CorticoTropic Hormone)	21
2.3. Le récepteur minéralocorticoïde et la superfamille des récepteurs nucléaires	21
2.4. Gène, transcrit et protéine MR.....	23
2.4.1. Structure du gène <i>NR3C2</i> chez l'homme et la souris	23
2.4.2. Les différents transcrits du MR.....	24
2.4.3. Organisation de la protéine MR.....	25
2.5. Sites d'expression du MR.....	29
2.5.1. Les tissus épithéliaux.....	29
2.5.2. Les tissus non épithéliaux.....	30

2.5.3. Les mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde.....	31
2.6. Mécanismes d'action, effets génomiques et non génomiques	33
2.6.1. Mécanisme d'action	33
a) Liaison de l'hormone	33
b) Translocation nucléaire	33
c) Interaction avec l'ADN	34
d) Recrutement de la machinerie transcriptionnelle	34
2.6.2. Effets génomiques du MR.....	39
a) Le canal épithélial à sodium	39
b) La pompe Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	41
c) La kinase Sgk1	42
d) La kinase WNK1	43
e) Le facteur de transcription GILZ.....	44
f) Autres gènes cibles.....	44
2.6.3. Effets non génomiques du MR.....	45
2.7. Régulation de l'expression et de l'activité du MR.....	47
2.7.1. Régulation transcriptionnelle de l'expression du MR.....	47
2.7.2. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression du MR	48
2.7.3. Les modifications post-traductionnelles du MR	49
2.8. Le MR en physiopathologie humaine.....	52
3. Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.....	57
3.1. Les protéines de liaison à l'ARN	57
3.1.1. Classification structurale des protéines de liaison par leurs domaines de liaison à l'ARN.....	58
a) Le Motif de Reconnaissance des ARN (RRM).....	58
b) Le domaine en doigt de Zinc (ZnF).....	59
c) Le domaine KH.....	59
d) Le domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD).....	59
3.1.2. Présentation et classification des sites de fixation des protéines de liaison à l'ARN	60
3.1.3. Les protéines de liaison à l'ARN	61
a) La famille des TIS11.....	61
b) La protéine AUF1 (ARE/poly(U)-binding/degradation Factor 1)	63
c) La famille des Hu protéines	63
d) La protéine TIA-1/TIAR.....	65
3.2. Les microARN	66

3.2.1. Biogenèse des microARN.....	66
3.2.2. Mode d'action des microARN.....	69
3.2.3. Dialogues croisés entre protéine de liaison à l'ARN et microARN.....	72
3.3. Contrôle de l'expression des transcrits par le épissage alternatif.....	74
3.3.1. Principes généraux sur le épissage.....	74
3.3.2. Eléments régulateurs de le épissage alternatif.....	76
3.3.3. Mécanismes de épissage alternatif.....	78
3.3.4. Mécanismes de dégradation des ARN associés à le épissage alternatif.....	79
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	82
RESULTATS.....	85
1^{ère} Partie : Action déstabilisatrice de la protéine Tis11b sur le transcrit MR en réponse à une hypertonicité et conséquences sur la signalisation minéralocorticoïde.....	85
1. Justification du projet.....	85
1.1. Contexte de l'étude.....	85
1.2. Modèle d'étude.....	85
1.3. Hypothèses de travail.....	87
1.4. Objectifs du travail.....	88
Article 1 : Hypertonicity Compromises Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling through Tis11b-Mediated Post-Transcriptional Control	
2. Données supplémentaires et autres éléments de discussion.....	89
2^{ème} Partie : Rôle de la protéine HuR dans l'augmentation de l'expression du MR en réponse à l'hypotonicité et dans l'édition de variants de épissage du MR.....	96
1. Justification du projet.....	96
1.1. Contexte de l'étude.....	96
1.2. Hypothèses de travail.....	97
1.3. Objectifs du travail.....	97
Article 2 : RNA-Binding HuR Splices and Stabilizes Mineralocorticoid Receptor Transcript Under Hypotonicity, Enhancing Renal Mineralocorticoid Signaling	
2. Données supplémentaires et autres éléments de discussion.....	99
3^{ème} Partie : Contrôle de l'expression rénale du MR par les microARN en réponse aux variations de tonicité extracellulaire.....	110
1. Justification du projet.....	110
1.1. Contexte de l'étude.....	110
1.2. Hypothèses de travail.....	110
1.3. Travaux déjà effectués par l'équipe.....	111

1.4. Critères de sélection des miARN.....	113
1.5. Objectifs du travail.....	114
2. Expériences de validation de la méthode de quantification des microARN	115
3. Résultats préliminaires	120
3.1. Effets de l'hypertonie sur l'expression des miARN dans les cellules KC3AC1	120
3.2. Effets du furosémide sur l'expression des miARN dans les reins de souris	121
4. Discussion	122
5. Poursuite du projet	127
6. Conclusion	128
DISCUSSION GENERALE	129
CONCLUSION GENERALE	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146
ANNEXES	

Table des Illustrations

Figure 1 : Représentation structurale du rein et de son unité fonctionnelle le néphron et ses différents segments.	9
Figure 1 bis : Le gradient cortico-papillaire.	10
Figure 2 : La réabsorption sodée dans le néphron.	12
Figure 3 : Sécrétion des hormones corticosurréaliennes par la glande surrénale.....	16
Figure 4 : Biosynthèse de l'aldostérone et du cortisol.	18
Figure 5 : Le système rénine-angiotensine-aldostérone.	20
Figure 6 : Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires. (D'après Mangelsdorf <i>et al.</i> 1995).	22
Figure 7 : MR : gène, isoformes et du transcrite et protéine.	25
Figure 8 : Représentation schématique de la structure modulaire du MR.....	26
Figure 9 : Sites d'expression du MR.	29
Figure 10 : Mécanisme de sélectivité minéralocorticoïde.....	32
Figure 11 : Mécanisme d'action du MR dans une cellule épithéliale polarisée.....	35
Figure 12 : Interconnexion des mécanismes post-transcriptionnels influençant le devenir des transcrits.	57
Figure 13 : Mécanisme de dégradation des ARNm initié par les protéines de la famille TIS11.....	62
Figure 14 : Biogenèse des miARN.....	67
Figure 15 : Mécanismes d'inhibition de la traduction par le complexe miRISC.....	70
Figure 16 : Mécanismes de dégradation des ARNm initiée par l'action des miARN et du complexe RISC.	71
Figure 17 : Schéma illustrant la compétition entre TTP et HuR pour la régulation de la stabilité d'un même ARNm.....	73
Figure 18 : Eléments régulateurs constitutifs de l'épissage.....	75
Figure 19 : Mécanisme d'action du spliceosome lors de l'épissage des introns.....	76
Figure 20 : Mécanismes de base de l'épissage alternatif.	77
Figure 21 : Différents modes d'épissage alternatif.....	79
Figure 22 : Stratégie d'oncogénèse ciblée chez la souris.....	85
Figure 23 : Expression du MR endogène dans les cellules KC3AC1 et localisation nucléocytoplasmique en réponse à l'aldostérone.	86
Figure 24 : Effet de l'hypertonie sur le transcrite et la protéine MR.....	87
Figure 25 : L'hypertonie extracellulaire stimule l'expression de TonEBP et de Tis11b.....	88
Figure 26 : Analyse de l'expression des membres de la famille TIS11 sous hypertonicité.....	90
Figure 27 : Expression rénale du transcrite GR lors d'un stress hypertonique.	92
Figure 28 : L'hypertonie modifie la réponse à l'aldostérone des cellules rénales.	94
Figure 29 : L'hypotonie augmente l'expression du MR <i>via</i> des mécanismes post-transcriptionnels.	96
Figure 30 : Analyse de l'expression des transcrits HuR et Tis11b dans les cellules KC3AC1 en réponse au stress osmotique.....	99
Figure 31 : Stratégie utilisée pour l'analyse <i>in vivo</i> des effets d'une hypertonicité extracellulaire relative sur la réabsorption de sodium stimulée par l'aldostérone et sur l'expression rénale du MR.....	101
Figure 32 : Effet de la modulation de la diurèse sur la réabsorption sodée chez la souris.....	103
Figure 33 : Identification et caractérisation du variant d'épissage 5,6 MR.....	105
Figure 34 : Immunodétection du variant d'épissage 5,6 MR dans les cellules COS-7.	107
Figure 35 : Analyse de la localisation subcellulaire de HuR par immunocytochimie.	108
Figure 36 : Stratégie d'identification des miARN régulés par l'hypertonie par l'approche TLDA.....	111

Figure 37 : Liste des miARN dont l'expression est modulée par les variations de tonicité.....	112
Figure 38 : Description du kit de amplification et de détection des miARN QuantiMiR.	115
Figure 39 : Expérience de validation de la méthode de quantification des miARN.	117
Figure 40 : Résultats de séquençage.	119
Figure 41 : Effet de l'hypertonie sur l'expression des miARN dans les cellules rénales KC3AC1.....	120
Figure 42 : Expression des miARN dans le rein des souris traitées par le furosémide.....	122
Tableau 1 : Les corégulateurs connus pour interagir avec le MR.	38
Tableau 2 : Séquences des amorces sens des miARN utilisés pour la qPCR en temps réel.	116

Liste des abréviations

3'UTR ou 5'UTR	<i>3qUntranslated Region ou 5qUntranslated Region</i>
3'ES ou 5'ES	<i>3qSplice Site ou 5qSplice Site</i>
11 HSD2	<i>11 -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2</i>
ACTH	<i>AdrenoCorticoTrophic Hormone</i>
ADN	<i>Acide DésoxyriboNucléique</i>
ADNc	<i>ADN complémentaire</i>
AF1	<i>Activation Function 1</i>
AGO2	<i>Argonaute 2</i>
AR	<i>Androgen Receptor</i>
ARN	<i>Acide RiboNucléique</i>
ARNm	<i>ARN messenger</i>
AldoR	<i>Aldose Reductase</i>
ARE	<i>AU Rich Element</i>
ASDN	<i>Aldosterone Sensitive Distal Nephron</i>
AUF1	<i>ARE/poly(U)-binding/degradation Factor 1</i>
AQP	<i>Aquaporine</i>
CCD	<i>Cortical Collecting Duct</i>
CNT	<i>Connecting Tubule</i>
ChIP	<i>Chromatine ImmunoPrecipitation</i>
CRM1	<i>Chromosome Maintenance 1</i>
cTAL	<i>portion corticale de TAL</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DCC	<i>Dextran Charcoal Coated</i>
DCT	<i>Distal Convoluted Tubule</i>
dsRBD	<i>doubled-stranded RNA Binding Domain</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EJC	<i>End Junction Complex</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ENaC	<i>Epithelial Sodium Channel</i>
ESE	<i>Exonic Sequence Enhancers</i>
ESS	<i>Exonic Sequence Silencers</i>
Gilz	<i>Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper</i>
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i>
GRE	<i>Glucocorticoid Response Element</i>
HRE	<i>Hormone Response Elements</i>
HnRNP	<i>Heterogeneous RNP ribonucleoprotein</i>
HTM	<i>High Throughput Microscope</i>
HuR/ELAV1	<i>Hu Antigen R/ Embryonic Lethal Abnormal Vision</i>
Hsp	<i>Heat shock Protein</i>
IMCD	<i>Inner Medulla Collecting Duct</i>
ISE	<i>Intronic Sequence Enhancers</i>
ISS	<i>Intronic Sequence Silencers</i>
KS-WNK1	<i>Kidney Specific WNK1</i>
LDB	<i>Ligand Binding Domain</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Phospho-Kinase</i>

MBS	<i>MR Binding Sites</i>
miRISC	<i>miRNA Induced Silencing complex</i>
miARN	<i>microARN</i>
MR	<i>Mineralocorticoid Receptor</i>
MRE	<i>MR Response Element</i>
mTAL	<i>portion médullaire de TAL</i>
NCC	<i>Na⁺-Cl⁻ Cotransporter</i>
Nedd4-2	<i>Neuronal Precursor Cell-Expressed Developmentally Down Regulated 4-2</i>
NFAT5	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells 5</i>
NF- B	<i>Nuclear factor B</i>
NHE3	<i>Na⁺/H⁺ exchanger</i>
NKCC2	<i>Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Apical Cotransporter</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>
NMD	<i>Non-sense Mediated mRNA Decay</i>
NTD	<i>N-Terminal Domain</i>
OMCD	<i>Outer Medulla Collecting Duct</i>
PHA1	<i>Pseudohypoaldostéronisme de type 1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3- kinase</i>
PR	<i>Progesterone Receptor</i>
PTC	<i>Premature Stop Codon</i>
PCT	<i>Proximal Convoluted Tubule</i>
RISC	<i>RNA Induced Silencing complex</i>
RBP	<i>RNA Binding Protein</i>
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i>
Sgk1	<i>Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1</i>
ShRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
snRNP	<i>Small Nuclear Ribonucleoprotein Particules</i>
SRAA	<i>Système Rénine Angiotensine Aldostérone</i>
SRC-1	<i>Steroid Receptor Coactivator-1</i>
TAL	<i>Thick Ascending Limb</i>
TGF-	<i>Tumor Growth Factor</i>
TIA-1	<i>T cell restricted intracellular antigen-1</i>
TIAR	<i>TIA-1 related protein</i>
TIS11	<i>Tetradecanoyl Phorbol Acetate (TPA)-induced-sequence 11</i>
Tis11b	<i>Tetradecanoyl Phorbol Acetate-induced-sequence 11b</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TonE	<i>Tonicity-responsive Element</i>
TonEBP	<i>Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein</i>
TTP	<i>TrisTeTraprolin</i>
WNK1	<i>With No lysine 1</i>
ZnF	<i>Zinc Finger</i>

Les abréviations anglaises sont en italiques

AVANT-PROPOS

Mon arrivée, au sein de l'Unité Inserm 1185 (anciennement 693), était au départ motivée par mon envie de reprendre mes études par un Master en biologie, après une formation initiale et une insertion professionnelle technique. Ainsi, j'ai eu l'occasion d'intégrer l'unité de recherche Inserm 1185, située à la Faculté de Médecine Paris Sud du CHU de Bicêtre, qui s'intéresse à la signalisation hormonale et à la physiopathologie des maladies endocriniennes et métaboliques.

Durant ce Master de l'École Pratique des Hautes Etudes, j'ai pu initier un projet passionnant, portant sur l'étude du contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du Récepteur Minéralocorticoïde (MR) par les variations de tonicité extracellulaire, en m'intéressant notamment aux effets de l'hypertonie sur l'expression du MR dans un modèle de cellules principales rénales, les cellules KC3AC1. Ce projet a été réalisé sous la direction scientifique des docteurs Say Viengchareun et Marc Lombès, Directeur de l'U1185.

Ensuite, j'ai eu l'opportunité de poursuivre ce projet de recherche durant mes trois années de Doctorat de l'Université Paris Saclay grâce à l'obtention d'un financement CORDDIM de la Région Ile-de-France. Dans ce projet doctoral, j'ai notamment cherché à caractériser les mécanismes moléculaires, qui contrôlent l'expression du MR en réponse à l'hypotonie et j'ai analysé leurs conséquences sur la signalisation minéralocorticoïde.

Ce projet s'inscrivait dans un programme de recherche plus vaste, appelé EPHIMIR, qui a été financé, de 2011 à 2014, par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR blanc 11-BSV1-028-01). Trois unités Inserm (U693, U1036 et U938) et la Plateforme de Protéomique 3P5 de l'Université Paris Descartes faisaient partie de ce consortium. Le projet scientifique avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression du MR mais également d'identifier de nouveaux gènes et protéines cibles du MR afin de préciser son implication dans divers processus physiopathologiques, qui aboutissent à des pathologies métaboliques, rénales ou cardiaques.

Ma participation à un tel projet collaboratif a été particulièrement enrichissante, grâce à l'apport de chacun des participants dans la caractérisation des fonctions exercées par le MR dans la physiologie et le développement de pathologies. Il a notamment conduit à la publication de cinq articles originaux dont je suis co-auteur et il a permis ma participation à de nombreux congrès scientifiques nationaux ou internationaux. Le travail présenté ici, résume les principaux résultats obtenus, au cours de mon Doctorat, sur les mécanismes

post-transcriptionnels régulant l'expression du MR et souligne également ma contribution dans ce projet collaboratif.

Le présent manuscrit sera organisé en quatre parties principales comprenant une Introduction, une partie Résultats, une Discussion Générale et une Conclusion Générale. Dans les trois chapitres de l'Introduction, nous développerons quelques rappels de physiologie rénale suivis par une présentation plus approfondie de l'aldostérone et de son récepteur, le Récepteur Minéralocorticoïde (MR). Nous terminerons par une description des acteurs impliqués dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. Une présentation des objectifs de la thèse conclura cette partie introductive.

Le corps du manuscrit, qui présentera l'ensemble des résultats obtenus, est divisé en trois grandes parties. Chaque article publié, soumis ou en préparation est précédé d'une brève introduction, posant les hypothèses ayant conduit au travail effectué, et est suivi d'un prolongement de la réflexion, par une courte discussion, accompagnée de résultats complémentaires, le cas échéant. Ainsi, dans la première partie des résultats, nous décrirons les mécanismes mis en place pour contrôler l'expression rénale du MR suite à un stress hypertonique. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication, en 2014, dans le journal *J Am Soc Nephrol*. Dans la deuxième partie des résultats, nous décrirons, les régulateurs post-transcriptionnels responsables du contrôle de l'expression du MR lors d'une hypotonie extracellulaire. La majeure partie de ce travail vient d'être soumis pour publication en 2016. Enfin, nous présenterons, dans la troisième partie de ce travail, les résultats préliminaires portant sur l'effet de la tonicité extracellulaire sur l'expression des microARN.

Une Discussion Générale synthétisant l'ensemble des résultats est présentée en troisième partie. Une Conclusion Générale suivie de la bibliographie clôture cette quatrième partie du manuscrit.

Enfin, sont présentées, en Annexe, des travaux auxquels j'ai participé durant mon Doctorat : Une première publication présente une étude sur les effets des hormones glucocorticoïdes sur la régulation du canal aquaporine 3 dans la réabsorption d'eau dans les cellules épithéliales de l'oreille interne. Une seconde publication rapporte enfin les résultats de l'étude clinique prospective PREMALDO, qui ont notamment permis de apporter une meilleure compréhension des mécanismes régulant la balance hydrosodée autour de la période périnatale chez le nourrisson prématuré.

INTRODUCTION

1. Homéostasie du sodium dans le rein

1.1 Rappels de physiologie rénale

Le rein est un organe qui assure une fonction majeure au sein de l'organisme en maintenant l'équilibre du bilan hydrosodé (entrées et sorties d'eau et de sodium). Au sein de l'organisme, la teneur en eau ou stock hydrique est répartie entre les compartiments intracellulaire et extracellulaire (secteur vasculaire et interstitiel), cette répartition reposant principalement sur le bilan sodé. Le rein assure, par ailleurs, d'autres fonctions dans le métabolisme phospho-calcique, l'érythropoïèse ainsi que l'équilibre acido-basique, en maintenant constante la concentration de potassium et le pH sanguin mais ces dernières fonctions ne seront pas développées dans le présent manuscrit.

L'osmolarité se définit comme la concentration des ions ou particules dissoutes par litre de plasma et l'osmolalité comme leur concentration exprimée par kilogramme de fluide. Les différents compartiments possèdent une osmolarité identique de 285 mOsmol/L mais une composition hydroélectrolytique différente. Ainsi, dans le compartiment intracellulaire, le potassium représente le cation principal alors que le sodium est celui qui prédomine dans le compartiment extracellulaire. Afin de maintenir cette osmolarité identique entre les deux compartiments intracellulaire et extracellulaire, des mécanismes fins de régulation des entrées et sorties d'eau permettent de conserver une concentration stable de sodium dans le sang (140 mmol/L dans le compartiment extracellulaire) et 15 mmol/L dans le compartiment intracellulaire. Grâce au contrôle de l'élimination du sel et de l'eau, le rein limite les variations de volume et d'osmolarité du milieu extracellulaire.

L'efficacité du contrôle rénal de la balance hydrosodée repose sur l'équilibre du débit filtré de sodium (varie en fonction de la natrémie et du débit de filtration glomérulaire) et celui de la réabsorption tubulaire de sodium. Afin de maintenir un bilan sodé nul, le rein réabsorbe plus de 99% du sodium filtré par le glomérule (Devuyst 2008). Par sa capacité d'adaptation, le rein régule efficacement le volume plasmatique et la pression artérielle en fonction des apports sodés journaliers. Ainsi, le rein est capable d'adapter, en fonction des besoins de l'organisme, la composition et la quantité des urines afin de maintenir en équilibre la volémie intracellulaire et extracellulaire (Meneton *et al.* 2005). Les travaux de Guyton ont permis d'établir le rôle primordial joué par le rein dans la régulation de la pression artérielle et de la balance sodée (Guyton 1991). De nombreux mécanismes de contrôle permettent, au sein de l'organisme, de répondre à une baisse de la pression artérielle ainsi qu'à une augmentation de la volémie et ce à différents niveaux. Ainsi, le système nerveux autonome se met rapidement en place (de quelques secondes à quelques minutes) dès qu'une baisse ou une

augmentation de la volémie est détectée au niveau des barorécepteurs, ce qui provoque soit une vasoconstriction, soit une vasodilatation (Thomas 2011). Un autre niveau de contrôle, celui-ci hormonal, se met alors en place. Il repose sur l'action de l'aldostérone et permet au rein d'augmenter ses capacités de réabsorption de sodium. Nous verrons son action plus en détail dans la suite du manuscrit.

1.2. Organisation structurale rénale

1.2.1. Architecture rénale

Le rein est un organe pair de 10 à 12 cm. Il peut se subdiviser en deux parties principales : le cortex et la médulla rénale. Le cortex rénal correspond à une couche externe, granulée qui s'étend sous forme de colonnes (colonnes de Bertin) vers l'intérieur du rein. Ces colonnes s'intercalent entre des couches internes striées radiales en forme de pyramides, qui correspondent à la médulla rénale. Chaque rein comporte 10 à 18 pyramides médullaires. La base de ces pyramides est proche de la zone du cortex, au sommet de ces pyramides ou papilles, sont accolées des calices. Des grands calices sont formés par l'association des calices. Par rein, on dénombre trois à quatre grands calices, ils se rejoignent pour former le bassinot ou pelvis rénal. Ce dernier se rapporte à un tube en forme deentonnoir qui débouche sur l'uretère permettant ainsi le transport de l'urine définitive formée par le rein jusqu'à la vessie (Lacour, 2013).

1.2.2. Le néphron

Le rein est constitué de milliers de néphrons, qui représentent l'unité fonctionnelle de cet organe essentiel. Le néphron peut être subdivisé en plusieurs segments présentant des caractéristiques fonctionnelles différentes afin d'assurer une réabsorption de sodium et d'eau optimale et le maintien du volume plasmatique et de la pression artérielle. On peut distinguer deux types de néphrons en fonction de la disposition du réseau capillaire péri-tubulaire : les néphrons juxtaglomérulaires, qui sont ancrés profondément dans la médulla rénale et les néphrons corticaux, qui sont plus superficiels et s'arrêtent au niveau de la zone interne de la médulla rénale (Mount DB, 2014). Chaque néphron est irrigué par un réseau de capillaires sanguins, qui lui est propre, ces derniers proviennent de l'artère rénale puis vont se développer en un réseau de capillaires péri-tubulaires, qui rejoindront ensuite la veine rénale. Comme cela est illustré dans la Figure 1, chaque néphron est constitué de deux parties : un compartiment initial où se fait la filtration du sang (corpuscule rénal) et un tubule rénal assurant la réabsorption d'eau et de sel et la sécrétion de potassium. Le corpuscule de Malpighi est constitué par la capsule de Bowman et le glomérule.

C'est au niveau du glomérule que le sang est ultrafiltré (environ 180 litres de plasma sont filtrés à un débit de filtration de 125 ml/min) et que l'urine primitive est formée. Les gros solutés sont ainsi ultrafiltrés au niveau du glomérule, une régulation et une réabsorption plus fine sont effectuées dans le reste des segments néphroniques et cette régulation sera présentée dans le paragraphe 1.4. Faisant suite au glomérule, le tubule rénal se décompose selon l'ordre suivant : tubule proximal, anse de Henlé, tubule distal et canal collecteur (Gueutin *et al.* 2012).

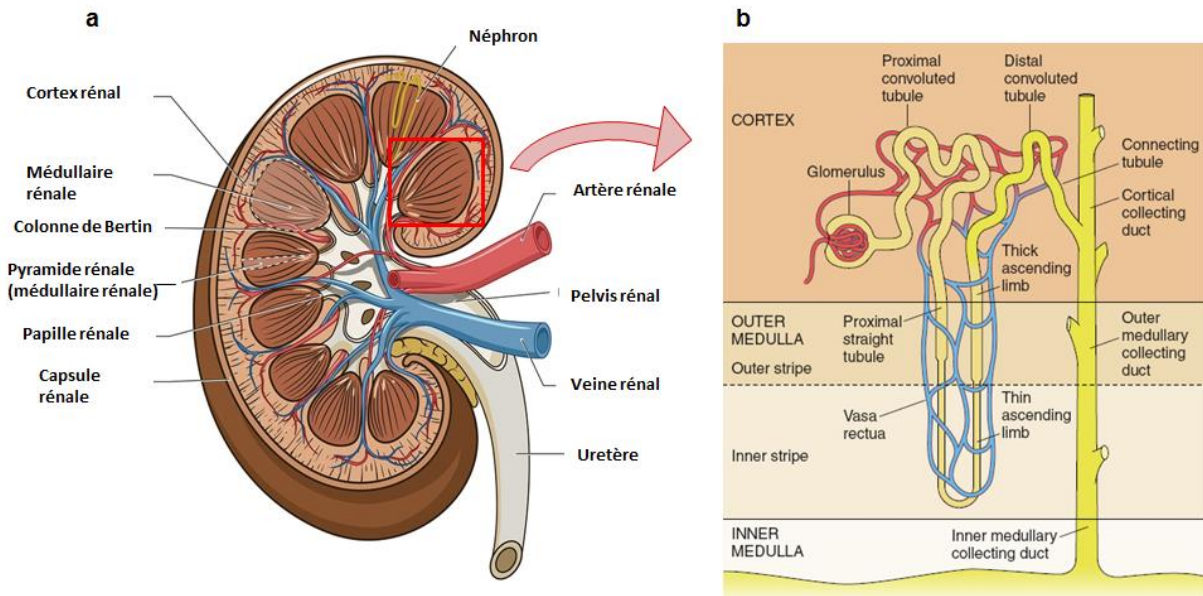


Figure 1 : Représentation structurale du rein et de son unité fonctionnelle le néphron et ses différents segments.

(a) Représentation du rein (D'après le site internet : <http://healthimpactnews.com/wp-content/uploads/sites/2/2016/02/Structure-of-the-kidney.jpg>) (b) Représentation des différents segments néphroniques (D'après Rossier, Baker & Studer, 2015).

1.3. Le gradient cortico-papillaire

La réabsorption active de sodium au niveau de la partie ascendante de l'anse de Henlé, qui n'est pas accompagnée par la réabsorption passive de l'eau, crée ainsi une différence d'osmolalité entre la médullaire et le cortex rénal, nommé gradient cortico-papillaire. Le gradient cortico-papillaire repose sur un système à contre-courant multiplicateur, qui va concentrer de plus en plus les urines passant à travers le tubule rénal plus précisément au niveau de la branche large descendante de l'anse de Henlé. Ce gradient est essentiel au transport de l'eau et des électrolytes. Il permet de concentrer l'urine primitive dans la partie descendante de l'anse, puisque ce segment est perméable à l'eau, et de diluer l'urine au niveau de la partie ascendante de l'anse de Henlé, qui est imperméable à l'eau, grâce à la réabsorption de sodium vers l'interstitium. Il résulte de ces mouvements d'électrolytes que

l'interstitium enrichi en sodium devient hypertonique. L'augmentation de l'osmolalité interstitielle va provoquer une fuite d'eau au niveau de la branche descendante afin d'équilibrer l'osmolalité de ce segment avec l'interstitium (Figure 1 bis, point 1). Il y aura ensuite une réduction de l'osmolalité du fluide tubulaire par réabsorption ionique réalisée dans la branche ascendante de l'anse de Henlé, ceci est représenté dans la Figure 1 bis (point 2). Au niveau du canal collecteur une concentration des urines est effectuée grâce d'une part à la perméabilité à l'eau de ce segment (notamment grâce à l'expression des canaux aquaporines) et d'autre part par réabsorption ionique au moyen de transporteurs spécifiques (Figure 1 bis, point 3). La réabsorption d'eau et d'ions dans ce segment permet la constitution d'urines matures. Cette réabsorption d'eau est aussi sous la dépendance de la force motrice générée par la différence de concentration osmolaire entre le fluide tubulaire et l'interstitium. Une réabsorption fine du sodium est également réalisée dans cette portion du néphron, ceci sera abordé plus précisément dans les chapitres suivants. Le gradient cortico-papillaire permet globalement de réabsorber une large part du sodium non réabsorbé par le tubule contourné proximal (Dantzler *et al.* 2014; Sands & Layton 2014).

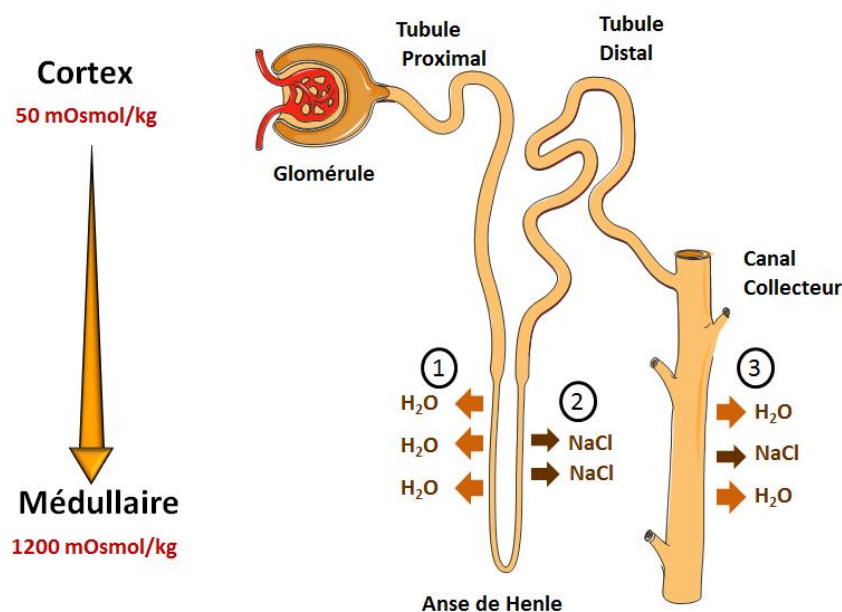


Figure 1 bis : Le gradient cortico-papillaire

1.4. Réabsorption de sodium et contrôle de la pression artérielle

1.4.1. Réabsorption de sodium dans le néphron

A la suite du corpuscule rénal, vient le tubule proximal, qui est constitué d'une partie contournée (Proximal Convoluted Tubule, PCT) et d'une partie droite (*Proximal straight tubule*). Le tubule proximal assure la réabsorption de la majorité de l'eau et du sodium (60 à

70%) contenu dans l'urine primitive *via* le transporteur NHE3 (Na⁺/H⁺ Exchanger) par couplage au bicarbonate HCO₃⁻ au niveau de la portion initiale et aux ions chlorures Cl⁻ dans la partie terminale du tubule proximal (Figure 2). Les cellules tubulaires proximales se caractérisent par une membrane apicale formant une bordure en brosse à cause des nombreuses microvillosités. Le long du segment proximal, l'aspect de ces cellules varie. Elles présentent moins de microvillosités diminuant la hauteur de la bordure en brosse ainsi que leur capacité de réabsorption.

Laanse de Henlé est composée d'un segment descendant grêle et fin et d'un segment ascendant et large (Thick Ascending Limb, TAL). Le segment ascendant peut être délimité en deux portions, une corticale ou cTAL et une autre médullaire ou mTAL, ce segment qui s'étend jusqu'à la jonction médullaire interne-médullaire externe. Le segment descendant permet la réabsorption de l'eau alors que le segment ascendant est le siège de la réabsorption de sodium (~25%) grâce au co-transporteur apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC2). Celui-ci coopère avec le canal potassique ROMK, présent à la membrane apicale, afin de recycler le potassium accumulé dans la lumière tubulaire maintenant une charge luminale positive. Coté basolatéral, la pompe Na⁺/K⁺-ATPase et les canaux chlore permettent la sortie des ions Na⁺ et Cl⁻. Au niveau de laanse de Henlé, deux types cellulaires ont été identifiés, des cellules à surface lisse (type S) et des cellules à surface rugueuse ou type R. Les cellules du type R possèdent une membrane apicale présentant quelques microvillosités, elles sont séparées par des jonctions intercellulaires perméables aux solutés et imperméables à l'eau (Mount, 2014). Un gradient cortico-papillaire est formé au niveau de laanse de Henlé, ce dernier est essentiel aux phénomènes de concentration et de dilution des urines comme nous l'avons vu précédemment (Mount 2014).

A la suite de laanse de Henlé, on retrouve en aval de la *macula densa*, le tubule contourné distal (Distal Convolute Tubule, DCT). Il débouche sur le canal collecteur cortical (Cortical Collecting Duct, CCD), qui correspond au dernier segment du néphron. Le DCT est responsable de environ 4% de la réabsorption de sodium avec un rôle déterminant assuré par le cotransporteur apical Na⁺-Cl⁻ (NCC), localisé à la membrane apicale des cellules (Gueutin *et al.* 2012).

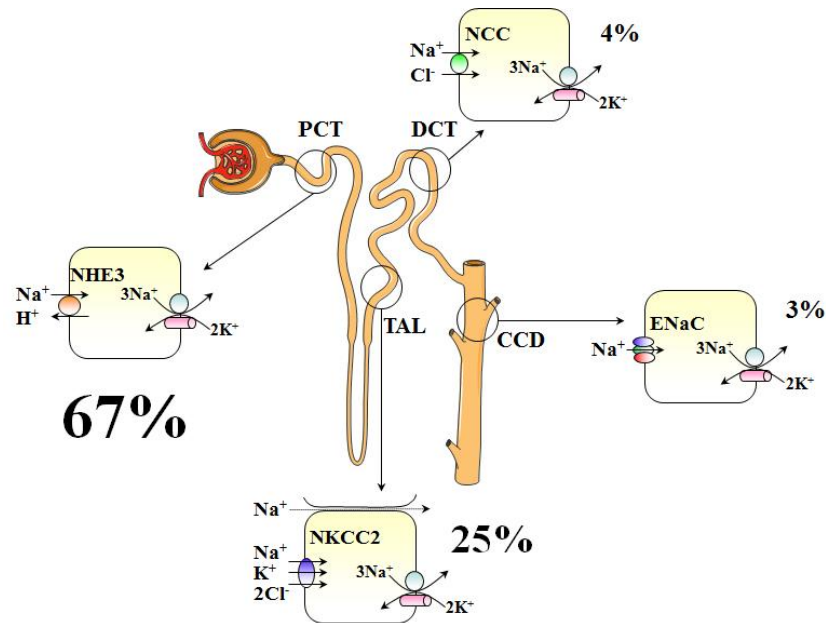


Figure 2 : La réabsorption sodée dans le néphron.

Les différents segments néphroniques : Glomerus (glomérule) ; Proximal convoluted tubule (PCT) ; Thick ascending limb (TAL) ; Distal convoluted tubule (DCT) ; Cortical collecting duct (CCD). Transporteurs : Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3) ; Na⁺-K⁺-ATPase ; Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC2) ; Na⁺-Cl⁻ (NCC) ; Epithelial sodium channel (ENaC). Le pourcentage de sodium réabsorbé par les segments néphroniques est également indiqué.

Le canal collecteur traverse toute la hauteur du rein en commençant dans le cortex externe et en se terminant au niveau de la papille rénale, ce qui lui permet de baigner dans des milieux de compositions ioniques et d'osmolarités différentes. Il peut être délimité en trois parties : le canal collecteur cortical, le canal collecteur médullaire externe (Outer Medulla Collecting Duct) et le canal collecteur médullaire interne (Inner Medulla Collecting Duct). Au niveau du CCD et de l'OMCD, deux types cellulaires sont identifiés, les cellules principales ou claires (60-65% des cellules) et les cellules intercalaires ou sombres (35-40% des cellules) (Gueutin *et al.* 2012).

Les cellules principales sont impliquées dans la réabsorption de sodium ultrafiltré assuré par le canal collecteur (~ 3%) et les cellules intercalaires dans le transport de bicarbonate et de protons. Les cellules principales possèdent une profonde invagination de la membrane basolatérale et une membrane apicale lisse avec de rares microvillosités et comportant un seul cil central. L'épithélium du canal collecteur possède des jonctions serrées ou des desmosomes qui vont empêcher tout transport paracellulaire et sont à l'origine de la résistance transépithéliale élevée de ces cellules. La réabsorption de sodium est rendue possible grâce au canal épithélial à sodium (ENaC) coté apical et à la pompe Na⁺,K⁺-ATPase coté basolatéral, la présence de ces deux transporteurs génère un transport actif et vectorisé de sodium depuis la lumière tubulaire vers le milieu intérieur. Ce transport génère un

gradient électrochimique avec un potentiel transépithélial négatif (-10 à -60 mV). Les cellules principales assurent également une sécrétion de potassium depuis le milieu intérieur vers la lumière tubulaire, et ce *via* le canal potassique ROMK exprimé à la membrane apicale. La sortie active de sodium repose sur la force motrice générée par l'activité de la pompe Na^+, K^+ -ATPase qui permet la sortie de trois ions Na^+ contre l'entrée de deux ions K^+ . Coté apical, l'entrée de sodium par le canal ENaC suit le gradient électrochimique. Les cellules principales sont également le siège d'une réabsorption hydrique transépithéliale reposant sur le transport de sodium et la force osmotique qu'il génère. La réabsorption hydrique est rendue possible grâce aux aquaporines AQP2, AQP3 et AQP4. L'expression du canal AQP2 est régulée par une stimulation par la vasopressine ou hormone antidiurétique. Les deux autres canaux sont constitutivement exprimés essentiellement à la membrane basolatérale (Park & Kwon 2015). Le canal collecteur joue un rôle primordial dans la régulation fine de la réabsorption rénale de sodium, de potassium et de l'eau (Férraille & Doucet 2001; Loffing & Schild 2005). Cette régulation fine assurée par les parties distales du néphron est sous la dépendance de mécanismes neuro-endocriniens précis répondant à une stimulation initiée par les barorécepteurs et volorécepteurs mais également sous le contrôle hormonal de l'aldostérone, mécanisme, qui sera abordé plus loin dans le manuscrit.

1.4.2 Contrôle rénal de la pression artérielle

Le rein joue un rôle essentiel dans la régulation de la pression artérielle en contrôlant notamment la volémie grâce au système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Ce système, en plus de son action directe sur la capacité du rein à réabsorber le sodium, est aussi capable de stimuler la vasoconstriction des muscles lisses et des artéioles rénales pour augmenter la pression artérielle, *via* l'angiotensine II (Connell *et al.* 2008).

La rénine est synthétisée par le rein au niveau des cellules de l'appareil juxtaglomérulaire. Ce dernier est formé par deux types de cellules spécialisées, les cellules juxtaglomérulaires localisées autour de l'artéiole afférente du glomérule et les cellules de la *macula densa* situées entre les artéioles afférentes et efférentes du glomérule. La rénine est également stockée dans l'appareil juxtaglomérulaire. Cette enzyme catalyse la transformation de l'angiotensinogène circulante d'origine hépatique en angiotensine I, ce qui constitue une étape clé dans l'activation du SRAA, permettant au final la production d'aldostérone par le cortex surrénalien (Connell *et al.* 2008). Le système SRAA sera développé dans le chapitre 2 où les mécanismes conduisant à la synthèse de l'aldostérone seront abordés.

1.5. Réabsorption de sodium dans le néphron distal sensible à l'aldostérone

L'aldostérone est au cœur du contrôle hormonal de l'équilibre hydroélectrolytique en agissant notamment au niveau des régions distales du néphron. Ces segments expriment le récepteur minéralocorticoïde (MR) leur permettant de répondre à la stimulation hormonale par l'aldostérone. Ces segments, regroupés sous le terme de « néphron distal sensible à l'aldostérone » (Aldosterone Sensitive Distal Nephron, ASDN), correspondent aux segments néphroniques suivants : DCT, CNT, CCD (Bachmann *et al.* 1999; Reilly & Ellison 2000). Le MR est un facteur de transcription permettant après fixation et activation par l'aldostérone d'initier la transcription de transporteurs ioniques importants pour la réabsorption sodée. Nous verrons au cours du chapitre 2.6.2, les protéines nécessaires à la réabsorption de Na⁺ dans le néphron distal sensible à l'aldostérone, telles que le canal épithélial à sodium ENaC et la pompe Na⁺,K⁺-ATPase.

1.6. Réabsorption d'eau dans le néphron distal

L'eau est l'un des composants majeurs du corps humain. En effet, elle représente 55 à 65% du poids total du corps humain, ce qui souligne l'importance de sa conservation. Environ 180 L de plasma sont ultrafiltrés quotidiennement par les reins, qui produisent environ 1 à 2 L d'urine définitive. Le rein permet ainsi de réabsorber la majeure partie de l'eau ultrafiltrée (99% d'eau), dont la majorité est réabsorbée de manière passive par osmose iso-osmotique. Ainsi, 70% de l'eau filtrée par les glomérules est réabsorbée au niveau du tubule proximal, 20% le seront par la branche descendante de laanse de Henlé, qui est perméable à l'eau et imperméable aux solutés, ce qui va entraîner un mouvement d'eau vers l'interstitium plus hypertonique. Au niveau de cette région du néphron, le fluide de la lumière tubulaire se concentre progressivement jusqu'à atteindre une osmolalité de 1200 mOsmol/kg dans la médullaire profonde. La branche ascendante de laanse de Henlé, qui est imperméable à l'eau mais qui est aussi le siège d'une réabsorption active de sodium, va participer localement à une baisse de l'osmolalité urinaire dans les régions corticales du tubule collecteur (50 mOsmol/kg). Afin d'équilibrer l'homéostasie hydrique au sein de l'organisme, une régulation fine de l'eau est effectuée dans les canaux et tubules collecteurs (CNT et CCD). Ce système de régulation s'adapte en fonction des apports et des besoins de l'organisme et en fonction des circonstances, la perméabilité à l'eau du néphron distal pourra y être restreinte (apports hydriques élevés) ou augmentée (faibles apports hydriques, conditions de restriction hydrique) (Hasler 2009). Ce transport d'eau est essentiellement sous le contrôle de l'hormone antidiurétique (ADH) ou arginine-vasopressine (AVP). Elle est synthétisée par les

noyaux supra-optiques et paraventriculaires de l'hypothalamus, puis stockée dans des granules de neurosecrétion (extrémités axonales). Elle sera libérée par l'hypophyse postérieure suite à des variations de l'osmolalité plasmatique, qui stimule l'expression de l'aquaporine 2 (AQP2), une fois liée à son récepteur, le récepteur vasopressine de type 2 ou V2R (Deen *et al.* 1994; DiGiovanni *et al.* 1994).

L'importance de la réabsorption hydrique par le néphron distal est notamment constatée dans le diabète insipide néphrogénique où la forme congénitale est associée à des mutations perte de fonction au niveau des gènes codant le récepteur V2R (90% des cas) et celui codant pour AQP2 (10% des cas) et se traduisant par un défaut dans la réponse rénale à la vasopressine. Cette pathologie se caractérise par une polyurie avec polydipsie, des épisodes de fortes déshydratations et des urines hypotoniques (Bichet & Bockenhauer 2016).

Nous venons de voir les mécanismes généraux, qui permettent au rein de jouer un rôle essentiel dans la réabsorption de sodium et d'eau. Grâce à la région distale du néphron, le rein possède une faculté importante d'adaptation aux besoins et aux apports journaliers de l'organisme. Cette région est sous la dépendance hormonale de l'aldostérone, qui peut initier *via* son récepteur, l'expression de différents transporteurs ioniques. L'expression de ces transporteurs permet une régulation fine et modulable de la réabsorption de sodium et d'eau, ainsi que l'excrétion de potassium. Le rôle de l'aldostérone et du MR sera abordé plus précisément dans le chapitre suivant. Nous verrons notamment les voies de biosynthèse de l'aldostérone, les mécanismes conduisant à l'activation du MR, ses actions génomiques et non génomiques. Un paragraphe sera également dédié à la description des situations pathologiques dans lesquelles l'expression du récepteur est altérée.

2. L'aldostérone et le récepteur minéralocorticoïde

2.1. Biosynthèse de l'aldostérone

L'aldostérone, qui est la principale hormone minéralocorticoïde chez l'homme, a été découverte dans les années 50 (Simpson *et al.* 1954; Tait *et al.* 2004). Elle est synthétisée à partir du cholestérol dans la zone glomérulée de la corticosurrénale (Haning *et al.* 1971).

2.1.1. Présentation de la surrénale humaine

La surrénale humaine est une glande endocrine, paire, localisée au-dessus des reins. Elle se décompose en deux parties, la corticosurrénale et la médulosurrénale. Au cours de l'ontogenèse, la surrénale subit deux phénomènes de zonation : le premier est temporel et le second est fonctionnel. Ces étapes sont essentielles au développement de la surrénale, à la mise en place de différentes zones de la corticosurrénale (la zone glomérulée, fasciculée et réticulée) mais également à la spécification des cellules impliquées dans la stéroïdogénèse ou cellules stéroïdogéniques (voir Figure 3).

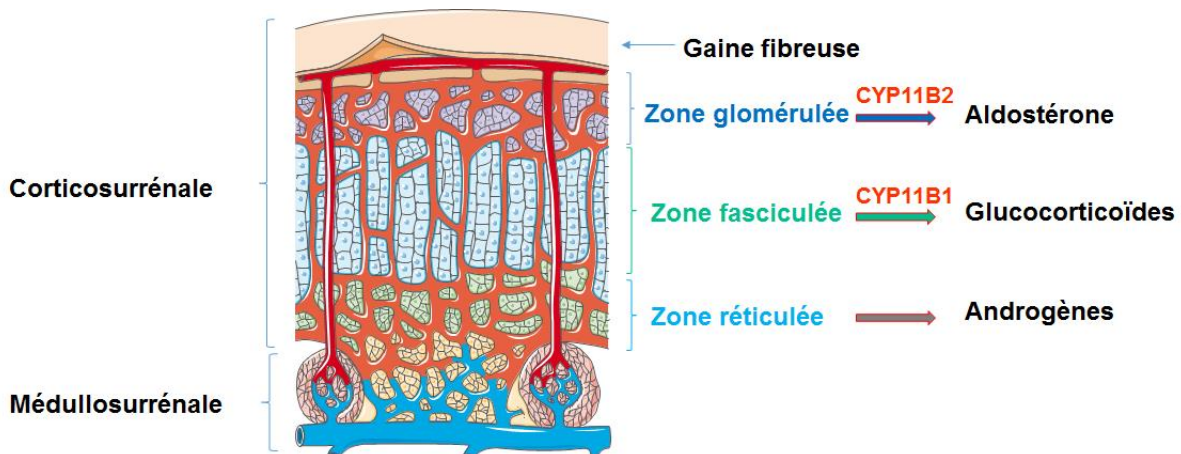


Figure 3 : Sécrétion des hormones corticosurrénaliennes par la glande surrénale.

(D'après Servier Medical Art).

Chacune des zones de la corticosurrénale assure un rôle qui lui est propre dans la biosynthèse des hormones surrénaliennes. Ainsi, la zone glomérulée exprime l'enzyme CYP11B2 ou aldostérone synthase, qui permet la production d'aldostérone. La zone fasciculée exprime l'enzyme CYP11B1, qui permet la synthèse du cortisol, une hormone glucocorticoïde chez l'homme. Enfin, la zone réticulée produit les androgènes surrénaliens. Ces voies de biosynthèse des hormones surrénaliennes, et particulièrement celle de l'aldostérone, sont mises en place et rendues fonctionnelles très précocement au cours du développement (Coulter & Jaffe 1998; Naccache *et al.* 2016).

2.1.2. Biosynthèse de l'aldostérone

La biosynthèse des hormones surrénaliennes fait intervenir une série d'enzymes possédant une activité isomérase, réductase ou bien encore oxydase dont le substrat initial principal est le cholestérol stocké dans les gouttelettes intracytoplasmiques des cellules corticosurréaliennes (voir Figure 4). La première étape correspond au transfert du cholestérol depuis la membrane externe mitochondriale vers la membrane interne de la mitochondrie sous l'action de la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) (Stocco 2001). La deuxième étape correspond à une succession de réactions enzymatiques réalisées par des déshydrogénases et des oxydases. Ainsi, le cholestérol est converti en prégnénolone par le cytochrome P450_{SCC} (side chain cholesterol cleavage, CYP11A1), la prégnénolone représentant le précurseur commun à toutes les hormones corticosurréaliennes. La prégnénolone est convertie ensuite en progestérone, 11-déoxycorticostérone (DOC), corticostérone par une série de réactions enzymatiques (Payne & Hales 2004). La dernière étape correspond à la conversion de la corticostérone en aldostérone grâce à l'action de l'aldostérone synthase (CYP11B2). L'aldostérone synthase va d'abord hydroxyler le carbone 11 pour former la corticostérone, qui sera ensuite hydroxylée sur son carbone 18 pour donner la 18-hydroxycorticostérone. Ce dernier composé sera finalement oxydé sur le carbone 18 afin d'obtenir une molécule d'aldostérone (Connell *et al.* 2008). A noter que les hormones possèdent une structure de 21 atomes de carbone mais l'aldostérone présente en plus une fonction 11-hydroxyle, qui lui permet de former un pont hémiacétalique avec le carbone 18. La production d'aldostérone est limitée en comparaison à celle du cortisol. En effet, le transfert de cholestérol vers la membrane interne mitochondriale constitue une étape limitante dépendant de la quantité et de l'activité du transporteur StAR. Le cortisol, synthétisé dans les zones fasciculée et réticulée par l'action directe de CYP11B1, a une production 100 à 1000 fois plus importante que celle de l'aldostérone. A noter que la synthèse des hormones stéroïdes est régulée par des mécanismes précis établis lors de la zonation fonctionnelle de la surrénale humaine (Bassett *et al.* 2004). Il a également été rapporté que la synthèse d'aldostérone et de cortisol pourraient avoir lieu dans des tissus extra-surréaliens (Connell *et al.* 2008). Ainsi, l'expression et la fonctionnalité des enzymes CYP11B1 et CYP11B2 ont été rapportées dans le système nerveux central (MacKenzie *et al.* 2000a, b) et dans le système cardiovasculaire (Takeda *et al.* 1994, 1995). Le rôle physiologique ainsi que l'action endocrine de ces hormones sur leurs récepteurs restent cependant à préciser dans les tissus.

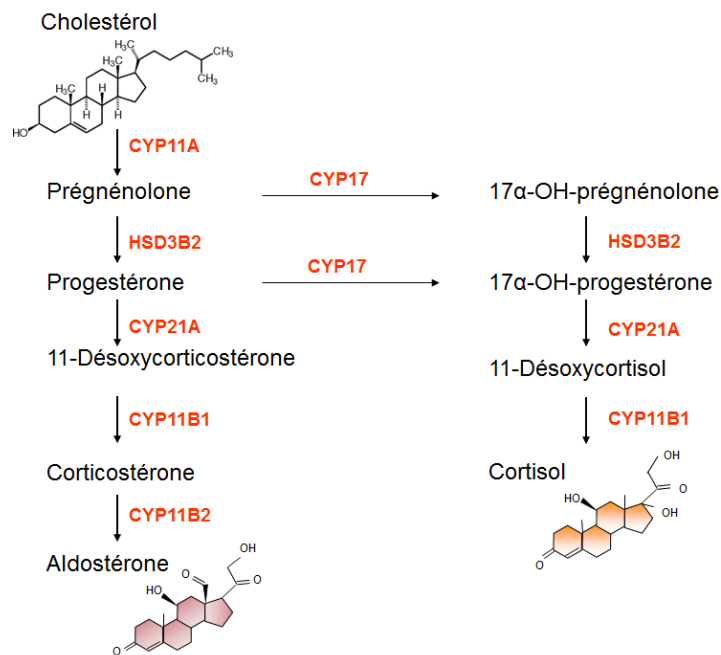


Figure 4 : Biosynthèse de l'aldostérone et du cortisol.

CYP11A : cholestérol desmolase, HSD3B2 : 3- β -hydroxystéroïde déshydrogénase, CYP17 : 17- α -hydroxylase, CYP21A : 21-hydroxylase, CYP11B1 : 11-hydroxylase, CYP11B2 : aldostérone synthase. (D'après Connell *et al.* 2008).

2.2. Régulation de la synthèse et de la sécrétion d'aldostérone

La régulation de la synthèse d'aldostérone peut être décomposée en deux phases : une première phase rapide, qui se met en place en quelques minutes suite à la stimulation (baisse volémie, augmentation de la kaliémie) et une deuxième, plus lente, qui correspond à une phase dite chronique. La première phase repose sur le transport du cholestérol à la membrane interne mitochondriale régie par la protéine StAR (Cherradi & Capponi 1998). La deuxième phase, qui se met en place après plusieurs heures voire plusieurs jours, permet la production d'aldostérone grâce à l'induction de l'expression de CYP11B2 (Condon *et al.* 2002). Trois régulateurs principaux ou sécrétagogues sont à l'origine de la synthèse et de la sécrétion d'aldostérone : l'angiotensine II, qui appartient au système rénine-angiotensine-aldostérone (Lumbers 1999), le potassium extracellulaire (Corvol *et al.* 1977) et l'ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone). Ces trois sécrétagogues seront décrits plus en détail dans les paragraphes, qui suivent. D'autres régulateurs modulent aussi la sécrétion d'aldostérone, tels que le facteur atrial natriurétique, la dopamine, la sérotonine mais l'action de ces régulateurs reste minoritaire (Connell *et al.* 2008).

2.2.1. Le système rénine-angiotensine-aldostérone

Ce système est sous la dépendance de plusieurs stimuli, qui vont conduire à la synthèse et à la sécrétion de rénine par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire puis à sa libération dans la circulation sanguine. Ainsi, la rénine est produite, soit à la suite d'une baisse de pression artérielle, détectée au niveau des artéioles efférentes du glomérule par des barorécepteurs, soit à la suite d'une baisse de la concentration de sodium dans le fluide luminal détectée au niveau de la *macula densa*. La rénine est également produite à la suite d'une stimulation du récepteur α -adrénergique *via* l'activation du système nerveux sympathique (au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire). Une fois sécrétée, la rénine hydrolyse l'angiotensinogène d'origine hépatique en angiotensine I, ce composé inactif est ensuite converti en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), comme vous pouvez le voir sur l'illustration de la figure 5. L'angiotensine II agit alors au niveau de la zone glomérulée de la corticosurrénale, stimulant ainsi après plusieurs étapes, la production d'aldostérone. La liaison de l'angiotensine II sur le récepteur couplé à une protéine G AT1R (Angiotensin Receptor 1) provoque la libération de la sous-unité Gq qui active la phospholipase C augmentant ainsi le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). L'augmentation du DAG et de l'IP₃ permet ensuite la mobilisation du calcium intracellulaire (Bassett *et al.* 2004), étape essentielle à l'activation de la calmoduline conduisant à la stimulation de la transcription du gène *CYP11B2* ainsi qu'à la production de StAR (Cherradi & Capponi 1998). Il a aussi été rapporté la capacité du complexe angiotensine II/AT1R à activer des voies parallèles de signalisation afin d'augmenter la production d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée. On peut citer, par exemple, la voie tyrosine kinase *scr* et celle de la 12-lipoxygénase (Bassett *et al.* 2004). De plus, l'angiotensine II possède un effet vasculaire direct et un effet antinatriurétique sur les tubules proximaux et distaux (Wang & Giebisch 1996), conduisant à l'augmentation de la pression artérielle (Atlas 2007; Connell *et al.* 2008).

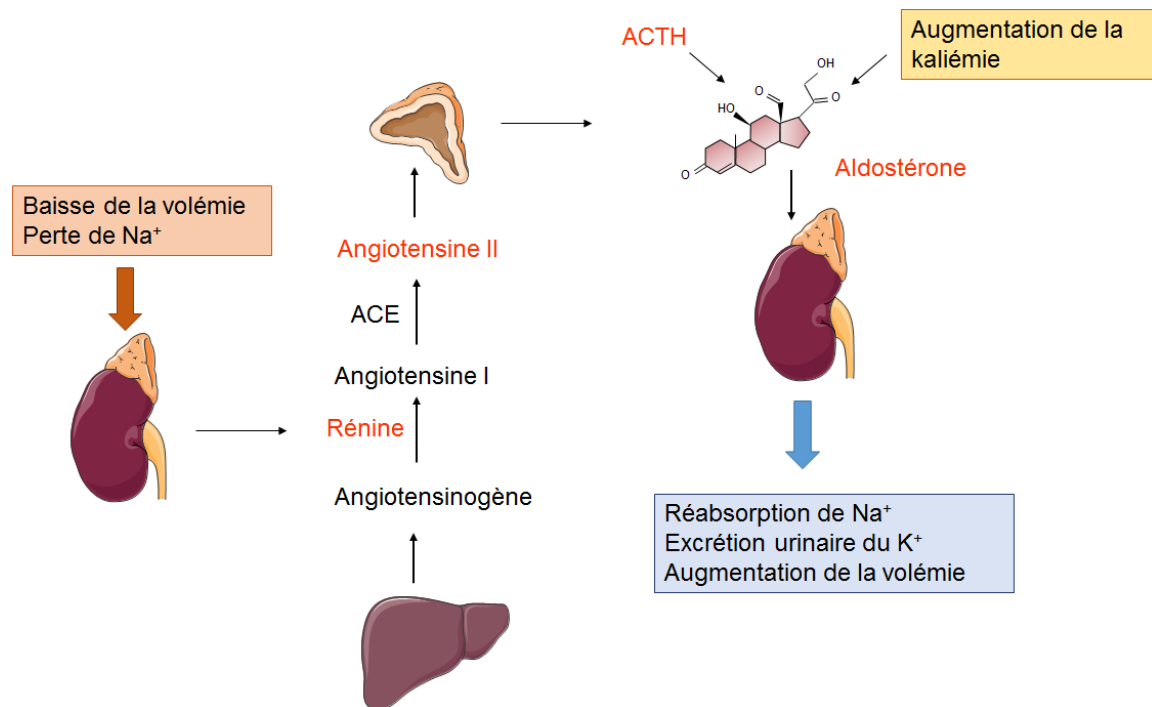


Figure 5 : Le système rénine-angiotensine-aldostérone.

2.2.2. Le potassium

La sécrétion d'aldostérone est sensible à de très faibles variations de la concentration de potassium extracellulaire. L'augmentation de la kaliémie provoque une dépolarisation des membranes des cellules de la zone glomérulée, entraînant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (T ou L). L'ouverture de ces canaux est à l'origine de la mobilisation du calcium intracellulaire ayant pour effet l'activation de la calmoduline, la production de StAR et la transcription du gène *CYP11B2* (Lotshaw 2001; Condon *et al.* 2002) et donc à plus long terme du maintien de la concentration de potassium à l'équilibre.

L'importance des canaux potassiques dans le contrôle de la production d'aldostérone a notamment été démontrée par les travaux du groupe de Eleanor Davies. En effet, l'inactivation chez la souris des gènes codant les canaux potassiques TASK1 et TASK3 (TWIK-related acid sensitive K channel 1 and 3), appartenant à la famille K2P (leak-type K⁺ channels of the 2P domains) et exprimés dans le cortex surrénalien, provoque une dépolarisation continue de la membrane et l'ouverture constante des canaux calciques voltage-dépendants générant un influx de calcium intracellulaire. L'ensemble de ces effets serait à l'origine d'une hyperproduction d'aldostérone rénine-indépendante (Davies *et al.* 2008). L'activation ectopique de l'aldostérone synthase au niveau de la zone fasciculée pourrait également expliquer ce phénotype (Bandulik *et al.* 2010).

2.2.3. L'ACTH (Adreno CorticoTropic Hormone)

L'ACTH est une hormone majeure de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien régulant la voie de biosynthèse des hormones glucocorticoïdes. Elle peut aussi participer au contrôle de la production de aldostérone. Ceci s'explique, en partie, par les effets paradoxaux de l'hormone, qui est capable d'activer la protéine kinase A (PKA), provoquant ainsi la synthèse de aldostérone mais selon un cycle bien précis comprenant une phase aigüe de synthèse, qui sera réprimée après une stimulation prolongée (Yoshida *et al.* 1991; Holland & Carr 1993). L'action de l'ACTH sur la production de aldostérone est plus faible par comparaison aux autres secrétagogues (angiotensine II, potassium) (Lis *et al.* 1981). Son action passe par une première étape de fixation à un récepteur couplé aux protéines G (MC2R) présent dans la zone glomérulée, puis par une activation de l'adénylate cyclase augmentant la concentration d'AMPc intracellulaire, et conduisant à l'activation de la PKA. De plus, d'autres voies AMPc-indépendantes mais induites par l'ACTH permettent de stimuler la production de aldostérone. Ces voies passent soit par la protéine kinase C, soit par un influx de Ca^{2+} en tant que second messenger de la voie ou bien par la voie des lipooxygénases (Connell *et al.* 2008).

2.3. Le récepteur minéralocorticoïde et la superfamille des récepteurs nucléaires

C'est bien après la découverte de son ligand, l'aldostérone, que le récepteur minéralocorticoïde ou MR a été identifié (Marver *et al.* 1974) et que son rôle dans la régulation de la réabsorption sodée a été mis en évidence (Funder *et al.* 1972). Néanmoins, ce n'est qu'au début des années 90, que son gène, ses isoformes d'ARNm ont pu être caractérisés pour la première fois (Arriza *et al.* 1987). Ce n'est que plus récemment, que ses sites d'expression, son mode d'action et ses gènes cibles ou bien encore ses partenaires moléculaires ont été en partie déterminés.

Les récepteurs nucléaires sont classés en 6 sous-familles, elles-mêmes subdivisées en 11 sous-groupes allant de A à K, selon la nomenclature établie par un consortium international en 1999 (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999). Cette classification repose sur l'évolution phylogénétique de deux domaines très conservés que sont le DBD (DNA Binding Domain) et le LBD (Ligand Binding Domain). Le MR (*NR3C2*) qui appartient à cette famille est classifié dans la sous-famille 3 des récepteurs stéroïdiens (NR3), dans laquelle on retrouve également le récepteur glucocorticoïde (GR, *NR3C1*), celui des œstrogènes ($ER\alpha$ et β , *NR3A1* et *NR3A2*) ou encore celui de la progestérone (PR,

NR3C3). Ces récepteurs, qui agissent comme des facteurs de transcription, sont fortement conservés au cours de l'évolution (Mangelsdorf *et al.* 1995). Ils assurent de nombreuses fonctions biologiques au sein d'organes variés et participent ainsi au maintien et à la survie de l'espèce (développement, différenciation cellulaire, homéostasie).

Ils agissent classiquement selon le mode d'action suivant : une fois liés à leur ligand au niveau cytoplasmique ou nucléaire, ils sont transférés dans le compartiment nucléaire où ils agissent positivement ou négativement sur la transcription de leurs gènes cibles après fixation au niveau de séquences *cis*-régulatrices. Ils partagent une organisation structurale identique correspondant à des domaines avec des fonctions spécifiques allant de A à F à la Figure 6 (Mangelsdorf *et al.* 1995). Ainsi, on retrouve un domaine N-terminal (domaine A/B ou NTD : N-Terminal Domain), qui varie en séquence et en taille au sein de la famille des récepteurs nucléaires, contenant plusieurs domaines de transactivation indépendants du ligand dont au moins un constitutivement actif (AF-1). Le domaine central de liaison à l'ADN, dénommé DBD pour DNA Binding Domain (domaine C), se compose de deux motifs à doigt de zinc, qui permettent la liaison du récepteur sur l'ADN au niveau de séquences spécifiques, appelées éléments de réponse à l'hormone HRE (Hormone Response Element). Le domaine D correspond à une région charnière (Hinge Region) qui contient, entre autre, un signal de localisation nucléaire, un site de phosphorylation permettant d'augmenter la capacité de transactivation du récepteur (Lee *et al.* 2006; Bain *et al.* 2007). Le domaine E, également nommé LBD pour Ligand-Binding Domain, permet, quant à lui, la liaison spécifique du ligand. La liaison du ligand induit un changement conformationnel du récepteur favorisant son activation. Un signal de localisation nucléaire, une interface d'interaction protéine-protéine, une interface de dimérisation et une fonction de transactivation ligand-dépendante (AF-2) sont également présents dans la région C-terminale ou domaine F du MR.

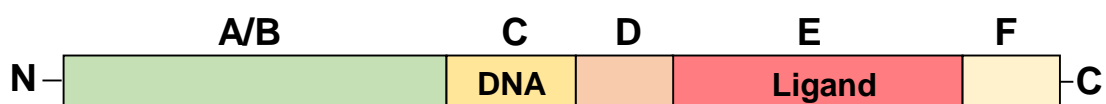


Figure 6 : Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires.

(D'après Mangelsdorf *et al.* 1995).

2.4. Gène, transcrit et protéine MR

2.4.1. Structure du gène *NR3C2* chez l'homme et la souris

L'utilisation de l'ADN complémentaire (ADNc) du GR comme sonde lors du « criblage » d'une banque d'ADNc de rein humain a permis l'isolement et le clonage de l'ADNc du MR humain par le groupe d'Evans (Arriza *et al.* 1987). Le gène *NR3C2* codant le MR humain (*hMR*) a ensuite été caractérisé. Il est situé sur le bras long du chromosome 4, plus précisément sur le locus 4q31.1-31.2 (Fan *et al.* 1989; Morrison *et al.* 1990). Il s'étend sur plus de 450 kb. La structure génomique complète a été déterminée par l'équipe de Fuller (Zennaro *et al.* 1995). Le gène *NR3C2* se compose de 10 exons et 8 introns, les deux premiers exons (1 α et 1) sont transcrits mais pas traduits. Ces derniers sont épissés alternativement dans l'exon 2. Les exons 2 à 9 sont, quant à eux, transcrits et traduits pour former une protéine MR fonctionnelle de 987 acides aminés (107 kDa). Les exons 2 et 9 sont les plus grands avec respectivement une séquence de 1759 pb et 2733 pb, les autres exons 1, 1 et 3 à 8 sont relativement courts avec une taille inférieure à 350 pb. Le NTD est codé entièrement par l'exon 2, dans lequel on retrouve également le site d'initiation de la traduction (ATG). Le DBD est codé par les exons 3 et 4 et le LBD est codé par les exons 5 à 9. Il est intéressant de noter, que les différents membres de la même sous-famille que le MR, présentent une structure génomique identique à celle du MR avec 8 exons codants, les exons 3 à 8 étant globalement de taille équivalente (Tilley *et al.* 1989; Encío & Detera-Wadleigh 1991; Misrahi *et al.* 1993).

Le gène *Nr3c2* chez la souris est, quant à lui, localisé sur le chromosome 8 et code une protéine de 978 acides aminés. Il est, en revanche, localisé sur le chromosome 19 chez le rat et possède 3 exons transcrits mais non traduits (1, 1 et 1) (Castrén & Damm 1993; Kwak *et al.* 1993). La conservation des exons entre les différentes espèces et la détection de différentes isoformes d'ARNm générées par des mécanismes d'épissage alternatif suggèrent des modes de régulation variables, temps-dépendants et tissus-spécifiques en fonction de la physiologie et/ou de la physiopathologie.

Le gène *NR3C2* présente deux régions promotrices en amont des deux premiers exons (1 et 1), nommées respectivement P1 et P2. Ces dernières n'ont pas la même activité transcriptionnelle basale, celle de P1 étant plus forte que celle de P2 (Zennaro *et al.* 1996). Il a été démontré que P1 est actif *in vivo* dans l'ensemble des tissus exprimant le MR, alors que le promoteur P2 ne semble être actif qu'au cours du développement (Le Menuet *et al.* 2000).

2.4.2. Les différents transcrits du MR

Le gène *NR3C2* possède deux exons (1 et 1') transcrits alternativement, générant deux ARNm hMR et hMR', qui codent une seule et unique protéine MR (Zennaro *et al.* 1997) (Figure 7). Ces deux isoformes sont exprimées chez l'homme à des niveaux identiques pour les différents tissus exprimant le MR (régions distales du néphron, entérocytes de la muqueuse colique, kératinocytes). Une seule exception est observée au niveau des canaux des glandes sudoripares où l'isoforme hMR' semble plus fortement exprimée (Zennaro *et al.* 1997). Néanmoins, il s'agissait d'une quantification de transcrits par hybridation *in situ* et les résultats devraient être confirmés par des techniques plus modernes, plus spécifiques et plus sensibles. Ces observations divergent pour le rat chez lequel l'isoforme hMR est plus fortement exprimée au niveau rénal (Kwak *et al.* 1993). A noter que certaines situations pathologiques (hyperaldostéronisme, hyperactivation des canaux ENaC) induisent une baisse significative de l'expression de hMR' sans affecter celle de la forme hMR, suggérant une régulation différente de l'expression de ces deux isoformes (Zennaro *et al.* 1997). Au cours de ce même travail, l'utilisation d'une ribosonde dirigée contre l'exon 2 a démontré des niveaux d'expression variables du hMR (isoformes hMR et hMR') dans les organes cibles de l'aldostérone (rein, glandes sudoripares > colon > épiderme > cœur).

Des variants du MR résultant d'un épissage alternatif ont été identifiés aussi bien chez l'homme que chez le rat. Dans le cerveau de rat, il a été mis en évidence une isoforme du MR, qui comporte une insertion de 12 pb, cette dernière étant exprimée dans les tissus cibles du MR (Bloem *et al.* 1995). Ce variant du MR possède 4 aa additionnels entre les deux motifs à doigt de zinc formant le domaine de liaison à l'ADN (ou DBD) et garde une activité transcriptionnelle comparable à celle du MR sauvage (Bahr *et al.* 2004), mais il est exprimé de manière différente en fonction des zones du cerveau (Wickert *et al.* 2000). Au niveau rénal, il a été mis en évidence chez l'homme et le rat, un autre variant du MR ne comportant pas l'extrémité C-terminale du domaine de liaison au ligand (LBD), ceci étant dû à une délétion de 10 pb (Zhou *et al.* 2000). Deux autres isoformes du MR sont générées à partir d'un épissage alternatif des exons 5 et 6 du hMR, les variants hMR⁵ et hMR^{5.6} (Zennaro *et al.* 2001). Ces derniers sont plus exprimés dans le rein, génèrent une protéine MR tronquée côté C-terminal (absence de région charnière et de LBD). De plus, ils ont une activité transcriptionnelle indépendante de la liaison de l'aldostérone et agissent de façon synergique avec le MR sauvage.

2.4.3. Organisation de la protéine MR

De manière similaire aux autres récepteurs nucléaires, la protéine MR possède un domaine NTD (N-terminal), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), une région charnière et aussi un domaine de liaison au ligand (LBD) (Pippal & Fuller 2008). Nous verrons de manière plus précise dans ce chapitre, les différents domaines fonctionnels constituant la protéine MR.

- Le domaine N-terminal (NTD)

Cette région est également la plus variable dans les récepteurs nucléaires avec seulement 15 % d'homologie de séquence. Ce domaine est le plus long de tous les récepteurs nucléaires avec une séquence de 602 acides aminés. Il existe une très forte homologie dans ce domaine entre les séquences MR des différentes espèces, qui atteint 85% chez les mammifères, soulignant la forte conservation au cours de l'évolution. Plusieurs domaines fonctionnels sont nécessaires à l'activité transcriptionnelle constitutive et ligand-indépendante (Figure 8).

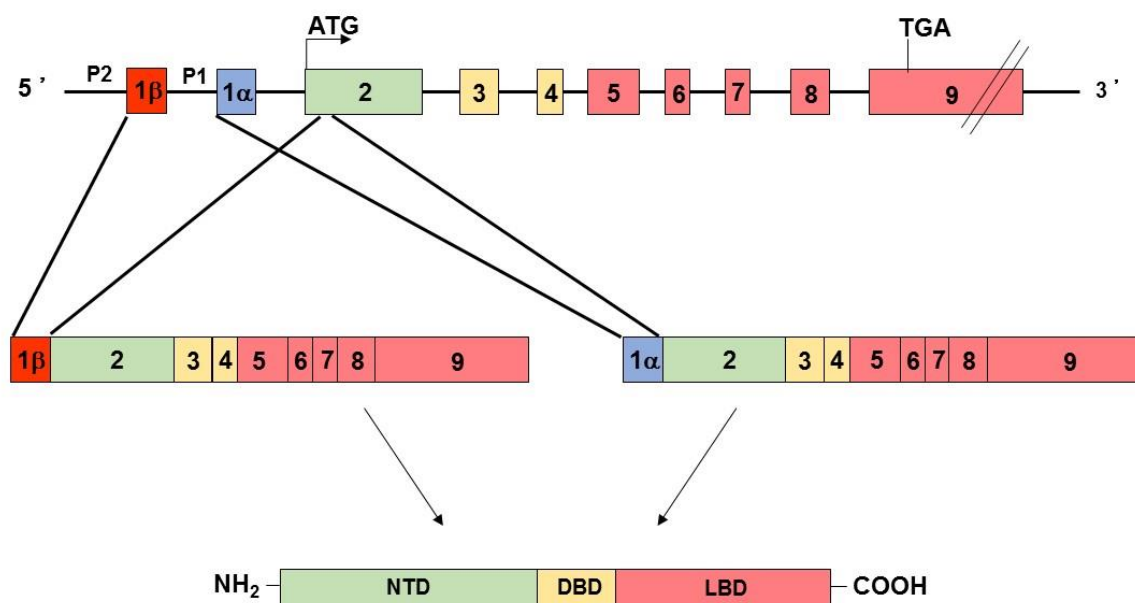


Figure 7 : MR : gène, isoformes et du transcrit et protéine.

MR : Récepteur Minéralocorticoïde, MR : isoforme alpha de l'ARNm du MR,
 MR : isoforme beta de l'ARNm du MR, NTD : domaine N-terminal, DBD : domaine de liaison à l'ADN,
 LBD : domaine de liaison au ligand

Ainsi, on retrouve deux domaines de transactivation AF-1a (résidus 1-167) et AF-1b (résidus 445-602) chez l'homme et la souris (Fuse *et al.* 2000; Tallec *et al.* 2003). Ces domaines participent à environ 40-50% de l'activité transcriptionnelle totale du MR en absence du domaine de transactivation ligand-dépendant du MR (AF-2) (Fuse *et al.* 2000; Zennaro *et al.* 2001; Pascual-Le Tallec *et al.* 2005). L'importance de ces domaines a été démontrée par

des expériences utilisant des mutants de délétion d'une des deux régions AF-1, dans lesquelles une réduction de plus de 97% de la capacité de transactivation du NTD a été observée (Fischer *et al.* 2010).

Un domaine central inhibiteur (ID, résidus 163-437) a également été identifié. Il réprime la capacité de transactivation des domaines AF-1a ou AF-1b (Tallec *et al.* 2003). Les domaines de transactivation permettent le recrutement de différents corégulateurs modulant ainsi l'activité transcriptionnelle globale du récepteur. Il apparaît également que le repliement de ce domaine permettrait d'augmenter les interactions protéines-protéines du NTD avec les différents corégulateurs, participant à la sélectivité minéralocorticoïde.

Les données de Fischer *et al.*, suggèrent que les domaines AF-1a et ID possèdent des structures secondaires peu stables, contrairement au domaine AF-1b plus stable (Fischer *et al.* 2010). Un paragraphe sur les corégulateurs sera développé plus tard dans le manuscrit. Le NTD comprend un système complexe de transactivation dû à la présence de domaines fonctionnels structurellement distincts.

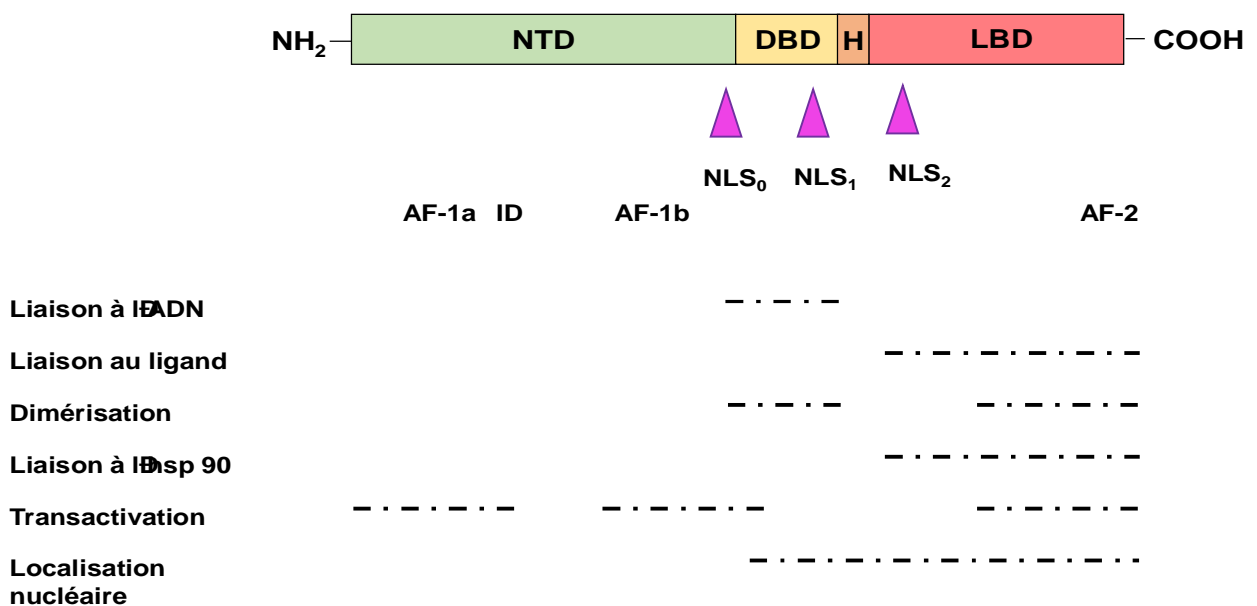


Figure 8 : Représentation schématique de la structure modulaire du MR.

Les pointillés représentent les zones possédant les fonctions décrites

NTD : domaine N-terminal, DBD : domaine de liaison à l'ADN

LBD : domaine de liaison au ligand, NLS : séquence de localisation nucléaire

AF : domaine de Transactivation, ID : région inhibitrice, hsp : *heat shock protein*

(D'après Pascual-Le Tallec *et al.*, 2005 et Viengchareun *et al.*, 2007).

- Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Ce domaine fortement homologue entre les récepteurs stéroïdiens (90%) permet à la protéine MR de se lier spécifiquement à l'ADN sur des séquences dénommées HRE (Hormone Response Element). Ces séquences sont présentes au niveau des régions régulatrices (promoteur, enhancers) des gènes cibles du MR. Les HRE, sont classiquement constitués par deux hémi-sites de 6 nucléotides organisés en palindromes plus ou moins parfaits et séparés par trois nucléotides. Grâce à une stratégie couplant immunoprécipitation de la chromatine et séquençage haut débit (ChIP-seq), notre laboratoire a pu identifier, pour la première fois, des séquences régulatrices spécifiques au MR nommées MBS (MR Binding Sites) (Le Billan *et al.* 2015). Par cette stratégie, environ un millier de MBS ont ainsi été identifiés dans une lignée rénale humaine répondant à l'aldostérone. Les analyses bioinformatiques ont permis de caractériser un motif consensus spécifique du MR, que nous avons appelé MRE (Mineralocorticoid Response Element) pour élément de réponse au MR. Ce motif MRE est constitué d'une séquence palindromique de 15 bases, composée de deux hémi-sites séparés par trois bases. La comparaison des différents MRE identifiés a mis en évidence que le motif xGxACx dans chaque hémi-site est le plus conservé. Cette dernière observation est à mettre en parallèle avec la résolution par cristallographie de la structure du DBD du MR lié à un MRE, qui a mis en évidence que seules les bases xGxACx forment des liaisons spécifiques avec certains acides aminés du DBD (Lys₆₂₄, Val₆₂₅ et Arg₆₂₉) (Hudson *et al.* 2014). Les séquences régulatrices MBS comportent soit un motif MRE complet, soit un unique hémi-site, soit une combinaison d'un MRE complet avec un ou plusieurs hémi-sites. Cette étude nous a également permis d'identifier un grand nombre de MBS, ne comportant pas de motif MRE, mais des éléments de réponse à d'autres facteurs de transcription comme AP-1, Fox, EGR1, suggérant une interaction fonctionnelle du MR avec ces facteurs de transcription (Le Billan *et al.* 2015).

Le DBD possède deux domaines à doigt de zinc, composés de 8 résidus cystéine et de deux atomes de zinc, cette région étant hautement conservée entre les récepteurs nucléaires. Chaque structure en doigt de zinc comporte 4 cystéines tétra-coordonnées autour d'un atome de Zinc. Ce motif, qui est retrouvé dans d'autres facteurs de transcription, permet de reconnaître les séquences spécifiques d'ADN et de lier l'ADN. Le premier doigt de zinc contient une boîte P (partie C-terminale), dans laquelle on retrouve les résidus Gly₆₂₁-Ser₆₂₂-Val₆₂₅ permettant la liaison à l'ADN. Le deuxième doigt de zinc contient la boîte D (partie N-terminale) composée par les résidus Ala₆₄₀-Gly-Arg-Asn-Asp₆₄₄, cette dernière étant impliquée dans l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation du MR avec le GR (Liu *et al.* 1995). Entre les deux doigts de zinc se trouve un signal d'export nucléaire (NES), dont la mutation provoque la rétention nucléaire du MR (Black *et al.* 2001; Sartorato *et al.* 2004). Au niveau de la région

C-terminale du DBD, un signal de localisation nucléaire (NLS₁, Figure 8) a également été identifié.

- La région charnière ou hinge region

Cette région comporte 61 acides aminés localisés entre les résidus 671 à 732 de la protéine MR. Elle présente une suite de résidus proline, qui confère à la protéine une certaine flexibilité lors du positionnement du DBD sur l'ADN et du recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Pascual-Le Tallec & Lombès 2005).

- Le domaine de liaison au ligand (LBD)

En absence de liaison à son ligand, le LBD du MR est maintenu dans une conformation permettant la formation d'une poche hydrophobe par les protéines de choc thermique (heat shock proteins ou hsp 70 et 90) et les immunophilines, qui sont des protéines chaperonnes. Après la liaison du ligand, ces dernières se détachent du LBD, démasquant le NLS₂, ce qui permet la translocation nucléaire du récepteur (Binart *et al.* 1991; Lombès *et al.* 1994; Pratt & Toft 1997). A noter également que le LBD se compose de 11 hélices numérotées de 1 à 12 (l'hélice H2 n'étant pas retrouvée par analogie avec les autres récepteurs stéroïdiens) et de 2 feuillets anti-parallèles, dont le repliement en 3 couches permet la formation de la poche hydrophobe dans laquelle peut se loger le ligand, et en particulier, l'aldostérone. Les hélices H3 à H7, H11 et H12 et le premier feuillet sont essentiels à la liaison du ligand du MR. Il est intéressant de noter que en fonction du ligand, des résidus spécifiques permettent l'interaction avec le ligand (Fagart *et al.* 1998, 2005; Bledsoe *et al.* 2005; Li *et al.* 2005). Deux sites polaires vont encadrer la poche hydrophobe afin de permettre le bon positionnement de l'aldostérone. Ainsi, le groupement cétone en position 3 de l'aldostérone se lie aux résidus Gln₇₇₆ (hélice H3) et Arg₈₁₇ (hélice H5), parallèlement le groupement 21-hydroxyl interagit avec l'hélice H3 via le résidu Asn₇₇₀ et la Cys₉₄₂ avec le groupement cétone en position 20. D'autres acides aminés (résidus 820 à 844) sont cruciaux pour la liaison sélective de l'aldostérone et la mutation de l'un de ces résidus entraîne une résistance à l'hormone (Sartorato *et al.* 2004; Rogerson *et al.* 2007). L'importance de ce domaine pour la sélectivité hormonale a pu être démontrée. En effet, la mutation du résidu 848 (hélice H7) provoque la perte de la spécificité hormonale entre le MR et le GR (Li *et al.* 2005). Le domaine de transactivation ligand-dépendant AF-2 de la protéine MR est formé par les hélices H3 à H5 et H12. L'entrée du ligand dans la poche hydrophobe entraîne l'activation du récepteur. Après liaison du ligand, l'hélice H12 effectue une rotation afin de fermer la poche hydrophobe et dans le même temps, les hélices H3, H5 et H11 subissent un réarrangement structural permettant la formation d'un sillon nécessaire au recrutement des corégulateurs (via leur motif LxxLL ou NR box) (Hellal-Levy *et al.* 2000).

2.5. Sites d'expression du MR

Bien qu'initialement, l'expression du MR n'ait été rapportée qu'au niveau des tissus épithéliaux à jonctions serrées tels que le rein (Marver *et al.* 1974), le colon (Pressley & Funder 1975) et jusqu'aux années 70, il est maintenant établi que le MR est aussi exprimé dans des tissus non épithéliaux (système nerveux central, cœur, tissus adipeux) où il assure différentes fonctions notamment sur la différenciation adipocytaire, la mémorisation ou encore dans le contrôle de l'appétit sodé. Au niveau cardiaque, le MR a été identifié comme un acteur majeur de la fibrose et du remodelage cardiaque (Fejes-Tóth & Náray-Fejes-Tóth 2007; Viengchareun *et al.* 2007). Les différents sites d'expression du MR sont indiqués sur la figure 9.

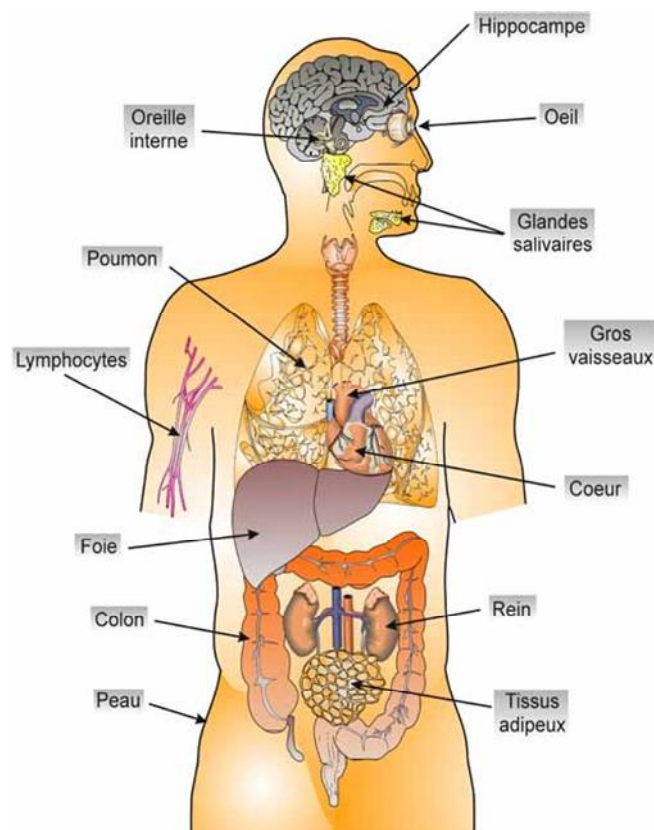


Figure 9 : Sites d'expression du MR.

Tiré de la thèse de S. Viengchareun, Diversité des effets minéralocorticoïdes : Apport de nouveaux modèles cellulaires différenciés établis par oncogénèse ciblée chez la souris, Université Paris Sud, 2005.

2.5.1. Les tissus épithéliaux

L'expression rénale du MR a d'abord été mise en évidence par immunohistochimie dans les segments distaux du néphron, région dénommée également ASDN. Ainsi, le MR est exprimé dans les tubules contournés distaux, les tubes connecteurs et les canaux collecteurs

(Krozowski & Funder 1981; Lombès *et al.* 1990a). Par la suite, l'expression du MR a été étendue aux glomérules, aux cellules mésangiales et aux podocytes (Miyata *et al.* 2005; Nishiyama *et al.* 2005; Shibata *et al.* 2013). Le MR est également exprimé au niveau du tractus digestif plus précisément au niveau de l'œsophage, du duodénum, du jéjunum, de l'iléon et du colon mais aucune expression dans l'estomac n'a été rapportée à ce jour. Cette expression a été démontrée aussi bien chez le rat (Pressley & Funder 1975; Fuller & Verity 1990) que chez l'homme (Lombès *et al.* 1984; Rafestin-Oblin *et al.* 1984). Le poumon est un autre tissu épithélial dans lequel le MR est exprimé (Krozowski & Funder 1981; Hirasawa *et al.* 1999). Enfin, le MR a été détecté au niveau de la peau (glandes sudoripares, sébacées, kératinocytes, follicules pileux) (Kenouch *et al.* 1994), de l'oreille interne (cochlée et canaux semi-circulaires) (Pitovski *et al.* 1993; Teixeira *et al.* 2006), de l'œil (rétine, iris, corps cillaires) (Mirshahi *et al.* 1997; Schwartz & Wysocki 1997), du foie (Duval & Funder 1974) ou bien encore dans les glandes salivaires (Funder *et al.* 1972).

De manière intéressante, l'expression du MR dans certains tissus épithéliaux (peau, colon, poumon) est souvent associée à celle du canal ENaC démontrant un rôle primordial du MR dans le contrôle de la réabsorption de sodium et de l'homéostasie sodée. De plus, il a été montré dans ces tissus l'expression concomitante de l'enzyme 11 HSD2, qui en convertissant le cortisol actif en cortisol inactif, prévient l'activation illégitime du MR par les glucocorticoïdes en assurant ainsi une activation sélective du MR par l'aldostérone (ce mécanisme sera précisé dans le paragraphe 2.5.3).

2.5.2. Les tissus non épithéliaux

Les travaux de Pearce ont permis d'établir que le MR est également exprimé dans le cœur (Pearce & Funder 1987). Il a ensuite été identifié plus précisément au niveau des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (Lombès *et al.* 1992). Le MR a été également identifié dans le cerveau (hippocampe, hypothalamus) (Van Eekelen *et al.* 1988; Herman *et al.* 1989; Han *et al.* 2005). Des fonctions du récepteur dans la mémorisation, l'apprentissage (Pavlidis *et al.* 1999), la réponse au stress (De Kloet & Derijk 2004) ou encore l'appétit sodé (Geerling & Loewy 2008) ont été mises en évidence. Le MR est également exprimé dans le tissu adipeux (adipocytes bruns et blancs) (Rondinone *et al.* 1993; Zennaro *et al.* 1998; Viengchareun *et al.* 2001; Caprio *et al.* 2007) où il assure un rôle dans la différenciation des pré-adipocytes (Rondinone *et al.* 1993) et dans la régulation du métabolisme énergétique (Kuhn & Lombès 2013a). De plus, le MR est exprimé dans les macrophages (Barish *et al.* 2005) les neutrophiles (Bergmann *et al.* 2010), l'utérus, les testicules, la rate et les muscles lisses (Le Menuet *et al.* 2000) et enfin dans le placenta (Hirasawa *et al.* 2000).

Au vu des nombreux tissus dans lesquels une expression du MR a été rapportée, son expression devrait être qualifiée d'ubiquitaire (Viengchareun *et al.* 2007). A ce jour, l'ensemble des fonctions jouées par ce récepteur n'a pas encore été totalement défini mais des liens avec le développement de certaines pathologies ont été néanmoins établis ; ces derniers seront abordés plus loin dans le manuscrit (chapitre 2.8).

2.5.3. Mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde

Chez l'homme, le MR possède deux ligands physiologiques : l'aldostérone, qui agit notamment au niveau des tissus épithéliaux et le cortisol au niveau des autres tissus non épithéliaux. Ces deux stéroïdes possèdent une affinité équivalente pour le MR mais le cortisol est présent à des concentrations circulantes 100 à 1000 fois supérieures à celle de l'aldostérone, rendant nécessaire des mécanismes de sélectivité pour l'action de l'aldostérone, prévenant ainsi l'activation illicite du MR par les glucocorticoïdes dans les tissus épithéliaux. Cette sélectivité minéralocorticoïde est assurée au moins à trois niveaux, notamment au niveau « pré-récepteur » dans les étapes, qui précèdent la liaison au récepteur, au niveau du « récepteur » et enfin au niveau « post-récepteur » (Pascual-Le Tallec & Lombès 2005; Fuller *et al.* 2012).

Le premier niveau repose essentiellement sur l'action de l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β HSD2). Cette enzyme transforme, en présence de NAD (Nicotinamide Adénine Di-nucléotide), le cortisol actif en cortisone, un composé inactif et incapable de lier le MR. Son action permet notamment d'assurer la sélectivité minéralocorticoïde dans les tissus épithéliaux cibles de l'aldostérone (Edwards *et al.* 1988; Funder *et al.* 1988). Il faut également prendre en compte qu'à l'opposé, certains tissus non épithéliaux, expriment la 11 HSD1. Cette dernière régénère la cortisone en cortisol, laissant ainsi supposer que dans ces tissus, le cortisol constitue le premier ligand physiologique du MR (Draper & Stewart 2005).

Au niveau du récepteur, la sélectivité minéralocorticoïde est assurée par les changements conformationnels du MR engendrés par la liaison du ligand, ces derniers sont spécifiques du type de ligand et entraînent une capacité de transactivation différente (Lombès *et al.* 1994). En effet, même si l'aldostérone et le cortisol possèdent une affinité équivalente pour le MR et des constantes de dissociation à l'équilibre (Kd) de même ordre de grandeur, leurs cinétiques de dissociation propres sont différentes (Lombès *et al.* 1994; Rogerson *et al.* 1999).

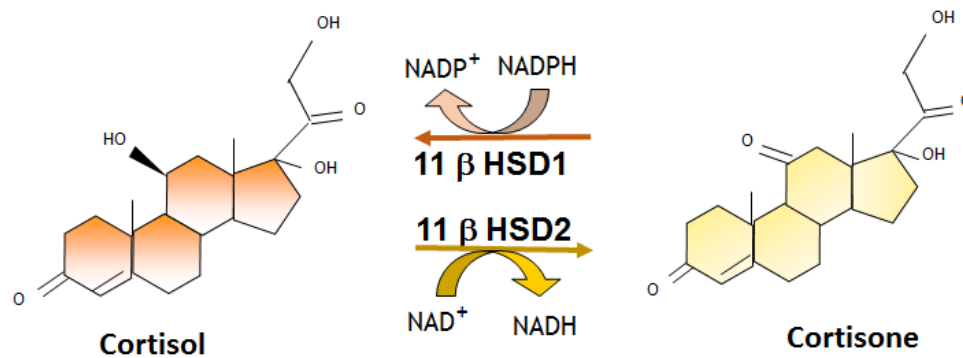


Figure 10 : Mécanisme de sélectivité minéralocorticoïde.

11 HSD1 : 11beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1,
 11 HSD2 : 11beta-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2,
 NAD+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide,
 NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit,
 NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit,
 NADP+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

En effet, il a pu être démontré que l'aldostérone, une fois liée au MR, se dissociait de manière beaucoup plus lente que le cortisol, ce qui indique que le complexe MR/ aldostérone est très stable (Hellal-Levy *et al.* 2000). De manière intéressante, la mutation S810L du MR, retrouvée dans une famille où certains patients souffrent d'une hypertension précoce et exacerbée pendant la grossesse (Geller *et al.* 2000), augmente la stabilité des complexes progestérone- et cortisone-MR, qui deviennent alors des agonistes du récepteur capables de l'activer (Geller *et al.* 2000; Rafestin-Oblin *et al.* 2003). L'ensemble de ces données souligne l'importance de la structure conformationnelle du complexe récepteur/ligand pour la sélectivité minéralocorticoïde.

Au niveau post-récepteur, c'est l'interaction du complexe ligand/récepteur avec des corégulateurs spécifiques à l'aldostérone ou au cortisol, qui est responsable de la sélectivité des actions de l'aldostérone (Pascual-Le Tallec & Lombès 2005). Une présentation plus précise des différentes caractéristiques de ces corégulateurs sera faite dans le paragraphe 2.6.1.

2.6. Mécanismes d'action, effets génomiques et non génomiques

Comme annoncé au début de ce chapitre, le MR est un facteur de transcription, qui relaye majoritairement les effets physiologiques de l'aldostérone dans ses tissus cibles. Nous verrons dans les chapitres qui suivent, le mécanisme d'action de ce récepteur. Nous aborderons, en particulier, ses effets génomiques, qui passent par l'activation de la transcription de gènes cibles mais aussi ses actions rapides non génomiques, qui reposent sur l'activation de messagers secondaires.

2.6.1. Mécanisme d'action

a) Liaison de l'hormone

L'activation du MR passe par plusieurs étapes successives. Elle est initiée par la fixation de son ligand lipophile (aldostérone ou cortisol), qui pénètre à travers la membrane plasmique et se lie au MR. En l'absence du ligand, le MR est localisé dans le cytoplasme où il est associé à des protéines chaperonnes comme les protéines de choc thermique (*heat shock protein*) hsp 70, hsp 90 et les immunophilines (Binart *et al.* 1991; Lombès *et al.* 1994). La fixation de ce complexe multiprotéique permet de maintenir le MR dans une conformation propice à sa liaison au ligand (Bruner *et al.* 1997; Pratt & Toft 1997). La liaison sélective de l'hormone au MR entraîne un changement conformationnel du récepteur (compaction du LBD, repliement de l'hélice H12), entraînant la dissociation de la majeure partie du complexe multiprotéique (Couette *et al.* 1996), au niveau du cytoplasme ou du noyau (Galigniana *et al.* 2010). Le récepteur lié à son ligand peut alors migrer vers le noyau pour agir comme un facteur de transcription.

b) Translocation nucléaire

Le démasquage et l'activation des séquences NLS de localisation nucléaire facilitent la migration du complexe ligand-récepteur vers le noyau. Ce dernier forme encore un complexe avec la protéine hsp 90, qui ne se dissociera qu'après transfert du récepteur dans le compartiment nucléaire (Grossmann *et al.* 2012). Le complexe passe à travers les pores nucléaires après interaction avec des importines (et) (Nishi & Kawata 2007). Chaque NLS agit de manière bien précise afin de faciliter la translocation nucléaire. Ainsi, le NLS0 (résidus 590 à 602) est phosphorylé sur la sérine 601 pour permettre la translocation nucléaire (Walther *et al.* 2005). Le NLS1 (partie C-terminale du DBD) facilite, quant à lui, l'import nucléaire du MR en coopérant avec les NLS0 et NLS2 (Walther *et al.* 2005) et le NLS2 (LBD) induit une translocation nucléaire dépendante du ligand. A noter que en fonction du type de ligand, la translocation sera plus ou moins rapide. En effet, la liaison d'un

agoniste du MR permet une migration rapide vers le noyau par comparaison à un antagoniste (Lombès *et al.* 1994; Amazit *et al.* 2015). L'export nucléaire du récepteur est, quant à lui, rendu possible grâce à une séquence NES (Nuclear Export Signal) située entre les deux doigts de zinc du DBD (Black *et al.* 2001; Galigniana *et al.* 2010).

c) Interaction avec l'ADN

Les travaux de Grossmann *et al.*, ont pu démontrer que la dissociation de la protéine chaperonne hsp 90 du MR n'avait lieu qu'après transfert nucléaire du complexe hormone/ligand (Grossmann *et al.* 2012). Ce dernier peut ensuite se dimériser et lier l'ADN au niveau de sites spécifiques, les MBS (Le Billan *et al.* 2015). De nombreuses études ont démontré que le MR était capable de former un hétérodimère avec le GR dans les cellules co-exprimant ces deux récepteurs, ce qui aurait pour effet de moduler leur activité transcriptionnelle propre (Trapp *et al.* 1994; Derfoul *et al.* 2000; Kiilerich *et al.* 2015). Un rôle potentiel de l'hétérodimère MR/GR a été suggéré dans les parties distales du néphron, où une co-expression des deux récepteurs existe et dans lesquelles différentes localisations subcellulaires ont été observées en réponse aux corticostéroïdes (Ackermann *et al.* 2010). De manière intéressante, deux groupes ont pu montrer des effets opposés de l'hétérodimère MR/GR sur la transcription des gènes. Ainsi, Trapp *et al.*, ont rapporté un effet synergique sur l'activation de la transcription dans des cellules de neuroblastome humain (Trapp *et al.* 1994). A l'opposé, Liu *et al.*, ont démontré une inhibition de la transcription (Liu *et al.* 1995). Ceci a été confirmé pour le MR et les GR1 et 2 de la truite (Kiilerich *et al.* 2015). Malgré l'homologie entre les DBD du MR et celui du PR (Progesterone Receptor) ou celui des androgènes (AR), aucune hétérodimérisation avec le MR n'a été prouvée à ce jour.

d) Recrutement de la machinerie transcriptionnelle

Une fois fixé sur l'ADN sous forme de dimère, le complexe MR/aldostérone permet d'initier le recrutement de différents composants de la machinerie transcriptionnelle et des corégulateurs, modulant l'activité du récepteur et conduisant à l'activation ou à l'inhibition de la transcription des gènes cibles. Le recrutement des corégulateurs modifie le remodelage de la chromatine et l'acétylation des histones afin de rendre l'ADN plus accessible à la machinerie transcriptionnelle et à l'action de l'ARN Pol II (Métivier *et al.* 2003).

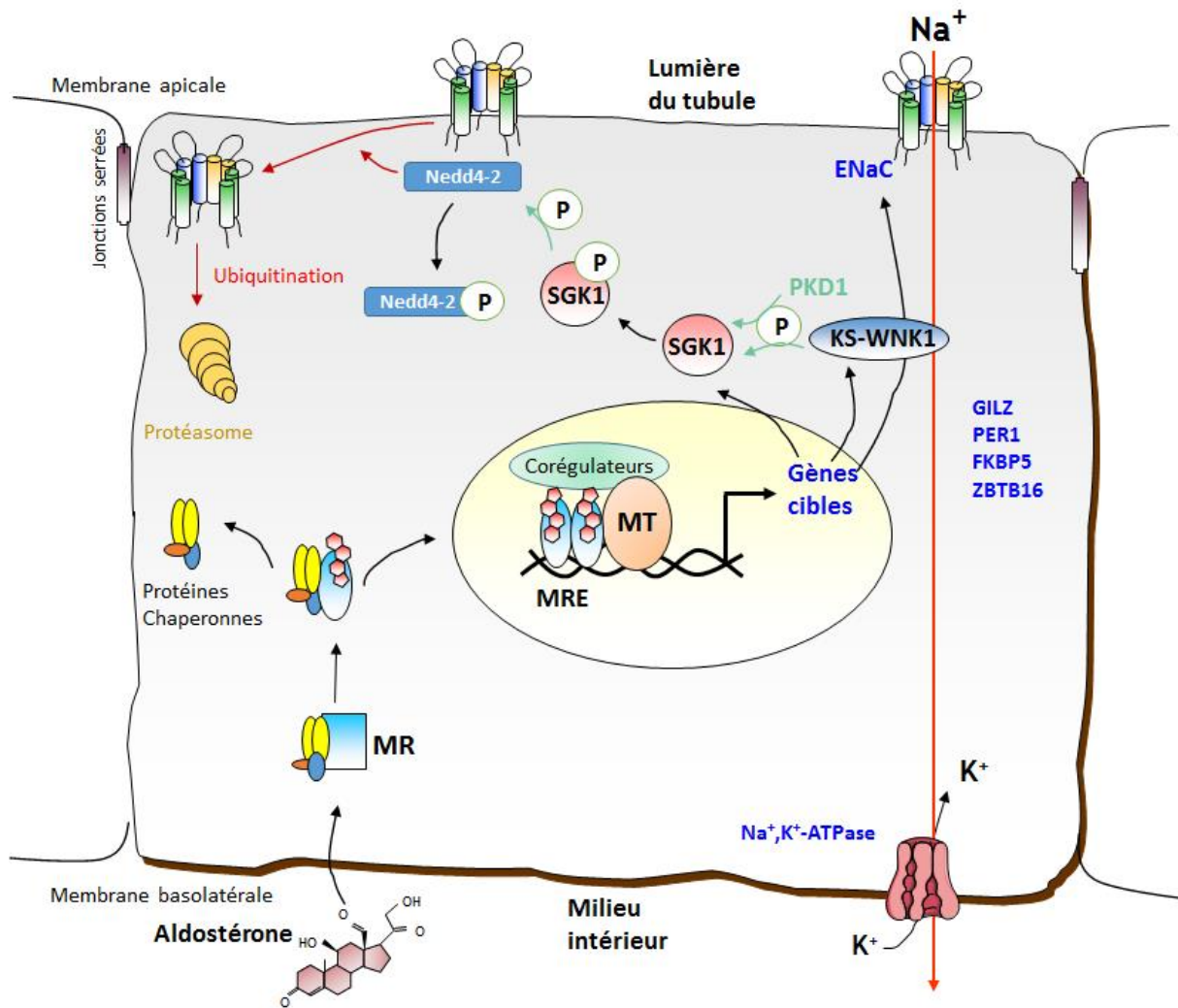


Figure 11 : Mécanisme d'action du MR dans une cellule épithéliale polarisée.

L'aldostérone pénètre dans la cellule par diffusion passive. La liaison de l'hormone au récepteur entraîne un changement de conformation du récepteur et la libération des protéines chaperonnes. Le récepteur activé, se dimérise et migre vers le noyau où il se fixe au niveau des séquences MRE pour initier la transcription de ses gènes cibles (indiqués en bleu). La transcription de *Sgk1* va prévenir l'action de Nedd4-2 sur le canal ENaC et réduire la dégradation du canal. L'action conjointe de la kinase Sgk1 et de Gilz permet le maintien à la membrane du canal ENaC. Le MR va également initier la transcription de gènes codant des transporteurs ioniques (ENaC, Na⁺,K⁺-ATPase), permettant ainsi la réabsorption de sodium depuis la lumière du tubule vers le milieu intérieur. En l'absence d'aldostérone, la protéine Nedd4-2 va se fixer sur le canal ENaC au niveau de motif PY (via ses motifs WW) permettant l'ubiquitination du canal et sa dégradation par le protéasome. Cette voie permet également le recyclage des canaux ENaC à la membrane. Abréviations : MT : machinerie transcriptionnelle ; MRE : MR response element. (D'après Viengchareun *et al.* 2007 et Le Billan *et al.* 2015).

Actuellement, pas moins de 350 corégulateurs agissant avec les récepteurs nucléaires ont été identifiés (Bulyanko & O'Malley 2011). Les coactivateurs participent à la stimulation de l'expression des gènes cibles suite à leur interaction avec des récepteurs activés par la liaison de leur ligand agoniste. Au contraire, la fixation d'un ligand antagoniste prévient l'interaction récepteur/coactivateur mais également les étapes de phosphorylation-dégradation essentielles au recyclage du MR provoquant son inactivation (Halachmi *et al.* 1994; Eggert *et al.* 1995; Amazit *et al.* 2015).

- Coactivateurs interagissant avec le MR

Les coactivateurs assurent de nombreuses fonctions telles que le remodelage de la chromatine, la modification de l'acétylation des histones (par une action directe ou par le recrutement d'histones acétyl-transférases), l'initiation ou l'élongation de la transcription (Auboeuf *et al.* 2007; O'Malley 2007). Ils peuvent également assurer un rôle de plateforme pour d'autres corégulateurs afin de permettre la formation d'un complexe transcriptionnel actif (McInerney *et al.* 1998). On peut citer l'exemple de SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1), qui possède une activité histone acétyl-transférase et qui assure un point d'ancrage pour les autres acétyl-transférases une fois lié sur le LBD. SRC-1 est également capable de recruter l'ARN polymérase II (Yang & Young 2009). Classiquement, les coactivateurs sont des grosses protéines de 160 à 200 kDa, qui possèdent trois domaines principaux : le domaine N-Ter, le domaine RID (Receptor Interacting Domain) et le domaine AD (Activation Domain) en position C-terminale. Le domaine RID présente souvent un ou plusieurs motifs d'interaction avec les récepteurs de type LXXLL (L : leucine, X : autre acides aminés), qui peut être retrouvé dans le domaine AD comme c'est le cas pour SRC-1. Pour la majorité des coactivateurs, la liaison aux récepteurs nucléaires se effectue au niveau de la région AF-2 du LBD et plus précisément grâce à une NR-box (Nuclear Receptor box). La NR-box est une région bien conservée possédant un ou plusieurs motifs LXXLL (Heery *et al.* 1997; Darimont *et al.* 1998). Le domaine AF-2 du MR est notamment capable d'interagir avec les motifs LXXLL des coactivateurs SRC-1, SRC-2, ou PGC-1 (PPAR Gamma Coactivator 1) (Yang & Young 2009; Fuller 2015). Certains coactivateurs interagissent directement avec le MR au niveau des régions AF-1 (SRC-1 et -2, p300/CBP (p300/ CREB Binding Protein) ou bien encore avec la région NTD comme par exemple Ubc 9 (Ubiquitin-like protein SUMO-1 conjugating enzyme). De nombreux coactivateurs, interagissant avec le MR, sont également capables d'interagir avec le GR activé mais leurs effets sont variables en fonction du contexte cellulaire (Obradovi *et al.* 2004; Yang & Fuller 2012).

- Corépresseurs interagissant avec le MR

Les corépresseurs inhibent l'expression des gènes par le recrutement et l'activation de désacétylases mais également en interférant avec les différents composants de la machinerie transcriptionnelle (Merrell *et al.* 2011). NCoR1 (Nuclear receptor CoRepressor 1) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor) sont les deux corépresseurs les plus connus et décrits. Ce sont de grandes protéines d'environ 2500 acides aminés pour une masse moléculaire de 270 kDa, ce qui facilite leur interaction protéique. L'analyse de leur séquence protéique a mis en évidence une forte homologie entre les deux corépresseurs (40%) (Ordentlich *et al.* 1999; Park *et al.* 1999). Ceci expliquerait en partie la similitude de leur organisation structurale. On retrouve trois domaines de répression (RD), qui possèdent des séquences conservées nécessaires à l'interaction avec les histones désacétylases ainsi qu'à leur activité de répression (Li *et al.* 2005). Un domaine DAD (Deacetylase Activation Domain), qui permet le recrutement des protéines remodelant la chromatine afin de promouvoir l'action des histones désacétylases (HDAC3) (Guenther *et al.* 2001). Enfin, dans la partie C-terminale de ces corépresseurs, il existe trois domaines de liaison aux récepteurs nucléaires (receptor interaction domain, RID). Ces domaines contiennent une région riche en isoleucine correspondant à des motifs de type I/L-XX-I/V-I (Hu & Lazar 1999) et nommée la CoRNR-box, elle permet l'interaction au niveau du LBD des récepteurs (Li *et al.* 1997). Cette interaction qui, de manière homologue aux coactivateurs, a lieu au niveau de la même région rend la liaison des corépresseurs et des coactivateurs mutuellement exclusive (Mottis *et al.* 2013).

D'autres corépresseurs, agissant sur le MR, ont été identifiés tels que PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated Signal transducer and activator of transcription 1) (Tallec *et al.* 2003), DAXX (Death Domain Associated protein) (Obradovi *et al.* 2004) et dernièrement NF- γ C (Nuclear transcription factor γ subunit gamma) (Murai-Takeda *et al.* 2010). PIAS1 inhibe par exemple, la transactivation du MR induite par l'aldostérone mais ne modifie pas son activité basale en absence de ligand, ce qui suggère que le changement conformationnel induit par l'aldostérone est nécessaire à la fixation de PIAS1 (Tallec *et al.* 2003).

Il y a actuellement une dizaine de coactivateurs et 5 corépresseurs identifiés comme interagissant avec le MR, ces derniers sont indiqués dans le Tableau 1. De nombreux exemples démontrent que la nature du ligand (aldostérone ou cortisol) conditionne l'affinité des coactivateurs pour le LBD (*via* sa conformation) et modifie son interaction avec les corégulateurs entre eux ou avec le NTD du MR (Fuller 2015).

Type de Corégulateurs	Noms	Domaine d'interaction avec le MR	Fonctions connues	Références
Coactivateurs	SRC-1	NTD ; AF-1 ; AF-2	Recrutement de complexes de remodelage de la chromatine ; initiation de la transcription, Faible activité histone acétylase	Hultman et al. 2005 Zennaro et al. 2001 Wang et al. 2004;
	p300/CBP	AF-1 ; AF-2	Activité histone acétyl-transférase ; recrutement de l'ARN polymérase II	Hsia et al. 2010; Yang et Young, 2009
	SRC-2 (ou TIF2)	AF-1 ; AF-2	Augmentation de la transactivation	Fuse et al. 2000; Wang et al. 2004
	PGC-1	AF-2	Recrutement du complexe de remodelage de la chromatine ; liaison du MR au complexe d'initiation de la transcription ; régulation du métabolisme énergétique	Hultman et al. 2005 Knutti et al. 2000
	ELL	AF-1b	Facteur d'élongation de l'ARN polymérase II	Le Tallec et al. 2005
	FLASH	AF-1	Régulation de l'apoptose	Obradovic et al. 2004
	FAF-1	AF-1	Régulation de l'apoptose	Obradovic et al. 2004
	Ubc-9	NTD	Enzyme de conjugaison SUMO-E2 dans voie de sumoylation	Yokota et al. 2007
	TIF1-	NTD	Recrutement de complexe de remodelage de la chromatine ; initiation de la transcription	Zennaro et al. 2001
	RIP140	AF-2	Modulateur des récepteurs nucléaires	Zennaro et al. 2001
Corépresseurs	SMRT	LBD	Recrutement des histones désacétylases	Wang et al. 2004
	NcoR	LBD	Recrutement des histones désacétylases	Wang et al. 2004
	DAXX	NTD	Régulation de l'apoptose, répression de l'activité du MR dans certaines cellules	Obradovic et al. 2004
	PIAS1	NTD, LBD	Enzyme de liaison SUMO-E3	Tallec et al. 2003
	NF-YC	AF-1	Inhibition des interactions N/C terminales	Murai-Takeda et al. 2010

Tableau 1 : Les corégulateurs connus pour interagir avec le MR.

SRC-1: Steroid Receptor Coactivator-1; p300/CBP: p300/CREB-Binding Protein; SRC-2: Steroid Receptor Coactivator-2; PGC-1 α : PPAR Coactivator-1-alpha; ELL: Elongation Factor 11-19 Lysine-rich Leukemia; FLASH: FLICE-Associated Hugeprotein; FAF-1: Fas-Associated Factor 1; RIP140: Receptor Interacting Protein 140; SMRT: Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor; NcoR: Nuclear Receptor Corepressor; DAXX: Death Domain-associated protein; PIAS1: Protein Inhibitor of Activated STAT1. (D'après Yang & Fuller, 2012).

2.6.2. Effets génomiques du MR

La réponse à la stimulation hormonale par l'aldostérone peut se décomposer en trois phases (démontrée par des expériences de patch-clamp sur les cellules A6) (Verrey 1999; Connell & Davies 2005). La première est une phase de latence qui dure environ une heure. La deuxième est qualifiée de « précoce » car elle débute entre une et six heures après la stimulation hormonale. Au cours de cette phase, l'aldostérone induit l'expression de protéines modulant l'activité de l'ENaC et de la pompe Na^+, K^+ -ATPase afin d'augmenter le transport de sodium depuis la lumière du tubule vers le milieu interstitiel. La troisième dite « tardive » est caractérisée par un transport de sodium élevé nécessitant la synthèse *de novo* de ces deux transporteurs.

L'identification d'autres gènes cibles, précocement induits par l'aldostérone, a permis de préciser un peu plus les mécanismes moléculaires permettant la réabsorption de sodium. Ces gènes cibles codent les kinases Sgk1 (Serum and glucocorticoid-related kinase 1) et WNK1 (With No Lysine 1) ou encore le facteur de transcription Gilz (Glucocorticoid-induced leucine zipper protein) (Chen *et al.* 1999; Náray-Fejes-Tóth *et al.* 1999, 2004).

a) Le canal épithélial à sodium

Le canal ENaC est une protéine membranaire de la famille des dégénéralines, composée par trois sous-unités, α , β et γ . Ces dernières sont probablement organisées selon la topologie suivante 1 1 1, par analogie avec la structure cristallographique du pore ASIC1 (Acid Sensing Ion Channel 1) (Firsov *et al.* 1998; Jasti *et al.* 2007), qui appartient à la même famille. Les trois sous-unités sont codées par 3 gènes distincts. Les gènes *SCNN1a* (sous-unité α), *SCNN1b* (sous-unité β) et *SCNN1g* (sous-unité γ) sont localisés respectivement sur les chromosomes 12 (locus 12p13) et 16 (locus 16p12.1 et 16p12.2) chez l'homme (Canessa *et al.* 1994). Il est exprimé dans de nombreux épithélia tels que les parties distales du néphron (tubule distal, cellules principales du tubule collecteur cortical et médullaire), l'épithélium de surface du colon mais aussi dans les épithélia de surface nasale, trachéale et bronchique (Farman *et al.* 1997), les canaux excréteurs des glandes salivaires et sudorales (Duc *et al.* 1994), la cochlée (Couloigner *et al.* 2001) et les kératinocytes (Brouard *et al.* 1999). Dans ces différents tissus, le canal ENaC assure de nombreux rôles tels que la clairance du liquide alvéolaire, la régulation de la fluidité du mucus, la sensation du salé des aliments ou encore dans la régulation de la composition électrolytique de l'endolymphe. Ce canal possède une sélectivité élevée pour le sodium par rapport au potassium, le rendant imperméable aux autres ions. Il présente une faible conductance pour le sodium (5 pS) (Rossier *et al.* 2015) et est très sensible à l'amiloride, un inhibiteur du canal (Kellenberger & Schild 2002).

A noter que des mutations de ce canal sont associées à des pathologies humaines, telles que le syndrome de Liddle (Hansson *et al.* 1995), une maladie génétique à transmission autosomique dominante due à des mutations activatrices, qui se caractérise par une hypertension sévère associée à une alcalose hypokaliémique et par un effondrement des taux de rénine entraînant une baisse de l'aldostéronémie. D'autres mutations inactivatrices des sous-unités β et γ sont associées à des formes récessives du Pseudoaldostéronisme de type 1 (PHA I). Cette observation a été corroborée dans des modèles animaux où l'inactivation de l'une de ces 3 sous-unités est létale dans les jours suivants la naissance. Ceci se traduit par une perte majeure de sel au niveau rénal rappelant le tableau clinique du PHA I, une maladie génétique autosomique récessive associée à de importantes pertes sodées, une hyponatrémie, une hyperkaliémie, une acidose métabolique ainsi qu'une augmentation des taux d'aldostérone et de rénine circulants (Hummler *et al.* 1997; Barker *et al.* 1998; McDonald *et al.* 1999; Rossier *et al.* 2013).

- Contrôle de l'activité et de l'expression de l'ENaC

Le canal ENaC voit son activité et son expression contrôlées à différents niveaux : par un contrôle transcriptionnel aldostérone-dépendant (Rossier 2014), par des modifications traductionnelles et post-traductionnelles (Butterworth 2010) et en dernier lieu par les oscillations circadiennes du transport de sodium générées par les rythmes de divers signaux externes (SRAA, horloge rénale interne) (Rakova *et al.* 2013). Ces mécanismes jouent un rôle important sur sa présence et son activité à la membrane apicale des cellules cibles en influant sa biodisponibilité et la probabilité d'ouverture de ces canaux.

L'expression apicale de l'ENaC dépend de l'expression de chaque sous-unité régulant ainsi la quantité des canaux néo-synthétisés. La sous-unité β est synthétisée dans le rein où l'aldostérone régule son expression *via* le MR. L'aldostérone prévient également l'action répressive de l'histone méthyltransférase Dot 1 (Disruptor of telomeric silencing 1) sur l'histone H3 au niveau de la lysine en position K79 (mono-, di- ou tri-méthylation) permettant ainsi la transcription de la sous-unité β de l'ENaC (van Leeuwen *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2006).

D'autres voies régulent également l'activité de l'ENaC au niveau des régions distales du néphron, ainsi on peut citer l'endothéline 1, l'ANP (Atrial natriuretic peptide), l'EGF (Epidermal Growth Factor) comme inhibiteur de l'activité de l'ENaC. Au contraire, l'angiotensine II, l'insuline ou bien encore la vasopressine augmentent l'expression et/ou l'activité du canal (Bugaj *et al.* 2009; Bankir *et al.* 2010; Rossier 2014).

b) La pompe Na^+, K^+ -ATPase

La pompe Na^+, K^+ -ATPase est une protéine ubiquitaire exprimée à la membrane basolatérale des cellules épithéliales, elle appartient à la famille des ATPases de type-P (ou E1, E2-ATPases) du fait qu'elle puisse être phosphorylée sur un résidu asparagine (dans le motif conservé DKTGT) (Horisberger 2004) lors de son cycle catalytique. Une des fonctions principales de cette famille de protéines est d'assurer le transport de cations. Cette pompe est capable d'extruder 3 ions sodium contre l'entrée intracellulaire de 2 ions potassium, ceci par un mécanisme de transport actif, qui nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Les transports et les échanges d'ions sont rendus possibles grâce au changement conformationnel de la pompe entre deux états E1 et E2 permettant de lier sélectivement les ions Na^+ et K^+ , selon le cycle d'Albers-Post (Férraille & Doucet 2001).

La pompe Na^+, K^+ -ATPase se compose obligatoirement de deux sous-unités : α et β associées selon une stoechiométrie de 1 :1 et d'une protéine transmembranaire régulatrice de 53 acides aminés (~10 kDa) appartenant à la famille des protéines FXYD (Jørgensen 1986; Horisberger *et al.* 1991). Quatre protéines FXYD (FXD-1, -2, -4 et -7) sont capables de s'associer avec la pompe Na^+, K^+ -ATPase (Geering 2006) mais seules les formes 2 et 4 sont exprimées dans le rein. Quatre isoformes de la sous-unité α et trois pour l'isoforme β sont actuellement recensées, la forme majoritaire $\alpha_1 \beta_1$ est aussi celle exprimée au niveau rénal. L'activité catalytique de la pompe est assurée par la sous-unité α qui possède les sites de fixation au sodium, au potassium et à l'ATP, elle possède également un site de fixation à l'ouabaine, un inhibiteur de la pompe. La sous-unité β joue un rôle dans l'assemblage de la pompe, sa stabilité et son positionnement dans la membrane plasmique (Geering 1991, 2008; Deng *et al.* 2013). Au niveau rénal, la sous-unité β (FXD-2 et -4) permet de moduler l'affinité de la pompe pour le sodium, le long du néphron (Barlet-Bas *et al.* 1990; Béguin *et al.* 2001; Wetzel & Sweadner 2001).

L'activité de la pompe est stimulée par le sodium et le potassium présents dans le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Ainsi, une augmentation de sodium intracellulaire (> 10 mM) va stimuler l'activité de la pompe afin de réduire la concentration intracellulaire de sodium à des valeurs normales. Par son action, la pompe Na^+, K^+ -ATPase permet le maintien des concentrations intracellulaires basses en sodium (10 fois inférieures à la concentration en sodium extracellulaire) et élevées en potassium (~140 mM). Elle est également à l'origine du gradient de sodium (et de potassium) entre les milieux intra et extracellulaires permettant ainsi un transport vectoriel de sodium vers le milieu intérieur. Ce gradient électrochimique généré permet, entre autre, de fournir l'énergie nécessaire à la réabsorption de sodium et à la sécrétion de potassium. Il permet aussi d'assurer le mouvement des solutés par une voie

paracellulaire au niveau des cellules épithéliales à faible potentiel électrique comme les cellules du tubule proximal où un tiers de la réabsorption de sodium se fait par cette voie (Feraille & Dizin 2016).

L'activité et l'expression à la membrane basale de la pompe au niveau du néphron distal est sous la dépendance de divers stimuli tels que la vasopressine (voie AMPc/PKA), l'entrée de sodium intracellulaire, la voie NF B ou bien encore la voie minéralocorticoïde (Feraille & Dizin 2016). L'augmentation du sodium apical et son entrée *via* le canal ENaC inhibe l'endocytose constitutive de la pompe et sa dégradation par le lysosome (Feraille & Dizin 2016). A noter également, le rôle de plus en plus évident de la kinase p38 dans l'inhibition de la dégradation de la pompe suite à l'augmentation du sodium intracellulaire provoquée par l'activité du canal ENaC (Wang *et al.* 2014).

c) La kinase Sgk1

Sgk1 comme son nom l'indique, est une kinase. Elle est précocement induite par l'aldostérone dès 30 minutes de stimulation à des doses physiologiques (Chen *et al.* 1999; Náráy-Fejes-Tóth *et al.* 1999; Bhargava *et al.* 2001). Deux autres isoformes de Sgk1 ont été identifiées, Sgk2 et Sgk3. Les isoformes Sgk1 et Sgk3 sont exprimées de manière ubiquitaires. Quant à la forme Sgk2, son expression est limitée au foie, au rein, au pancréas et au cerveau (Satoh *et al.* 2015).

La kinase Sgk1 joue un rôle important dans la réabsorption de sodium dans les segments néphroniques distaux, en phosphorylant la protéine Nedd4-2, une ubiquitine-ligase. En effet, Nedd4-2 est liée en condition normale à ENaC au niveau de motifs PY grâce à sa boîte WW. La phosphorylation des sérines 338 et 444 inhibe sa capacité à ubiquitiner le canal ENaC prévenant ainsi sa dégradation par le protéasome (Bhalla *et al.* 2006). Nedd4-2 permet à l'état basal de réguler l'expression de ENaC ainsi que le renouvellement des canaux à la membrane apicale (insertion de nouveaux canaux, dégradation des anciens). La protéine Sgk1, en plus de son action préventive sur l'ubiquitination et la dégradation de ENaC, permet l'action de la sérine-protéase CAP1 ou prostatine (Vallet *et al.* 1997; Narikiyo *et al.* 2002) (Narikiyo *et al.* 2002) qui activent ENaC.

- Contrôle de l'activité de Sgk1

Sgk1 est synthétisée sous forme inactive avant d'être activée par les kinases PDK1 et PDK2 (3-phosphoinoside-dépendant kinase 1/2) en réponse à l'insuline (Wang *et al.* 2001) afin de stimuler les canaux ENaC, NCC et NHE3 et d'inhiber le canal ROMK (Satoh *et al.* 2015). De nombreux autres stimuli sont capables d'activer Sgk1, tels que les glucocorticoïdes (Webster

et al. 1993), le facteur TGF- β (Transforming Growth Factor beta) (Waldegger *et al.* 1999; Lang *et al.* 2000) mais également la tonicité. En effet, l'hypertonie stimule son expression dans les cellules rénales A6 (Chen *et al.* 2009).

L'inactivation de *Sgk1* chez la souris ne se traduit pas par des effets délétères sévères lorsqu'elle est en condition normosodée (Wulff *et al.* 2002). Une fuite de sodium est néanmoins constatée en régime hyposodée (condition connue pour stimuler la sécrétion d'aldostérone). L'absence d'effet est probablement due à des mécanismes compensatoires mis en place suite à cette hyperaldostéronémie grâce aux isoformes 2 et 3 de la kinase, qui possèdent une forte homologie de leur domaine catalytique. De plus, l'isoforme *Sgk3* est exprimée de manière ubiquitaire à l'image de *Sgk1* (Wulff *et al.* 2002; Satoh *et al.* 2015).

d) La kinase WNK1

La kinase WNK1 (With No Lysine 1) appartient à la famille des sérines/thréonines kinases composée de quatre membres (allant de 1 à 4) (Xu *et al.* 2005a) est précocément induite par l'aldostérone (Náray-Fejes-Tóth *et al.* 2004) et elle est exprimée sous la forme de deux isoformes de taille variable : une isoforme longue WNK1 et une isoforme courte KS-WNK1 spécifique au rein. Cette expression spécifique rénale est rendue possible grâce à l'utilisation d'un promoteur alternatif localisé avant l'exon 4a. Ce promoteur permet l'épissage des quatre premiers exons générant le transcrite correspondant à l'isoforme courte de WNK1.

Le rôle joué par les WNK dans la réabsorption a été mis en évidence par la découverte de mutations en lien avec des cas d'hypertension familiale hyperkaliémique tels que le syndrome de Gordon ou le PHA II (Wilson *et al.* 2001a). L'équipe de Naray-Fejes-Toth a, par ailleurs, démontré que l'expression de l'isoforme courte KS-WNK1, dans les cellules rénales M1, fait augmenter le transport transépithélial de sodium (Náray-Fejes-Tóth *et al.* 2004). Cette isoforme également régulée par l'aldostérone, joue un rôle dans l'activation de ENaC et la réabsorption sodée en stimulant, après traitement par l'aldostérone, la voie de la PI3-kinase, qui est à l'origine de l'activation de *Sgk1* (Xu *et al.* 2005a, b; Roy *et al.* 2015). De plus, WNK1 module l'expression des co-transporteurs NCC (au niveau du DCT), NKCC1 et NKCC2 (au niveau du TAL), en phosphorylant ORS1 (Oxidative-stress responsive 1) et SPAK (STE20/SPS1-related protein- alanine-rich kinase) (Moriguchi *et al.* 2005; Vitari *et al.* 2005).

Le mécanisme moléculaire impliqué dans la stimulation des WNK kinases par l'aldostérone et d'autres hormones (insuline, vasopressine, angiotensine II) n'était pas encore connu jusqu'à récemment, due en partie à la difficulté de définir la structure et l'organisation des

domaines de ces protéines. Le travail de Roy et de ses collaborateurs a permis de rapporter un début de réponse : l'analyse du gène WNK1 (32 exons) a permis l'identification de deux motifs PY, connus pour interagir avec Nedd4-2, au niveau des exons 11 et 12 du gène WNK1. Les auteurs ont pu démontrer l'action de Nedd4-2 sur le recyclage de WNK1. Ils ont également montré que lors d'une stimulation par l'aldostérone, Sgk1 réprime l'action de Nedd4-2 sur WNK1 (Roy *et al.* 2015). De plus, il apparaît au vu de certains travaux que l'isoforme L-WNK1 régulerait positivement NCC alors que l'isoforme courte inhiberait l'activité catalytique des autres WNK. Ces résultats originaux démontrent une complexité supplémentaire dans les mécanismes mis en jeu après la signalisation hormonale pour réguler la réabsorption de sodium.

e) Le facteur de transcription GILZ

La découverte du facteur de transcription GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper protein) en tant que médiateur de l'action de l'aldostérone, découle entre autres de l'observation d'un phénotype modéré lors de l'inactivation génique de Sgk1 (Naray-Fejes-Toth *et al.* 2004 ; Naray-Fejes-Toth *et al.* 2008) chez la souris en comparaison des phénotypes sévères observés chez les souris KO MR ou ENaC. Par ailleurs, l'inhibition de la PI3K, un facteur nécessaire à l'activation de Sgk1, ne conduit pas à une abolition complète du transport de sodium après une stimulation hormonale par l'aldostérone (Wang *et al.* 2001). L'action de GILZ et de la kinase Sgk1 facilite l'insertion et le maintien du canal ENaC à la membrane apicale des cellules rénales. GILZ inhibe la voie des ERK (Extracellular signal-regulated kinase) connue pour limiter la réabsorption de sodium en présence de EGF (Epithelial Growth Factor), notamment (Bhalla *et al.* 2006).

f) Autres gènes cibles

Plus récemment, notre équipe a pu mettre en évidence, dans une lignée rénale humaine, par la technique de immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), des cibles génomiques sur lesquelles est recruté le MR (Le Billan *et al.* 2015). De nouveaux gènes cibles du MR ont ainsi été proposés. L'aldostérone stimule la transcription de ces gènes selon une dynamique de recrutement bien précise permettant de classer les gènes cibles en fonction de la cinétique rapide, intermédiaire ou lente de l'activation de la transcription du gène correspondant. Les gènes *PER1* (Period Circadian Clock1), *FKBP5* (FK506 Binding Protein) et *ZBTB16* (Zinc Finger and BTB domain containing 16), ont par ailleurs déjà été rapportés comme étant des acteurs importants de la signalisation minéralocorticoïde. En effet, *PER1*

est connue pour réguler la rythmicité du transport de sodium en stimulant la transcriptionnelle de ENaC dans les cellules du canal collecteur (Richards *et al.* 2013a, b). Le gène *FKBP5* code une protéine de choc thermique, qui interagit et stabilise les protéines MR cytosoliques (Petrovich *et al.* 2014). Quant au gène *ZBTB16*, celui-ci code un régulateur négatif du canal ENaC, suggérant l'existence d'un rétrocontrôle négatif sur la réabsorption de sodium après une stimulation prolongée par l'aldostérone (Náray-Fejes-Tóth *et al.* 2008). Les autres gènes identifiés, tels que la *SERPINE1* (Serpine peptidase inhibitor, clade E) ou encore *TPRG1* (Tumor protein p63 regulated 1), dont la fonction sur la signalisation minéralocorticoïde n'a pas encore été définie, constituent de nouvelles pistes dans la compréhension du rôle joué par l'aldostérone et le MR dans le contrôle hormonal du transport ionique (Le Billan *et al.* 2015).

Il est important de noter que certains des gènes cibles de l'aldostérone identifiés dans le rein sont vraisemblablement présents dans d'autres cellules cibles extra-rénales. Dans ce contexte, d'autres gènes minéralocorticoïde-sensibles restent à identifier, rendant compte des effets physiologiques de l'aldostérone dans des tissus autre que le rein.

2.6.3. Effets non génomiques du MR

En plus des effets classiques de l'activation du MR par l'aldostérone sur la transcription des gènes cibles, des effets rapides non génomiques sont associés au complexe MR/aldostérone. Ces effets ont été évoqués pour la première fois dans les années 70 (Spach & Streeten 1964) mais ce n'est que vingt ans plus tard que les premières démonstrations ont été publiées dans les tissus cibles de l'aldostérone (Christ *et al.* 1993, 1994; Wehling *et al.* 1994). Ainsi, des effets rapides de l'aldostérone ont été rapportés dans les cellules endothéliales, les lymphocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires, le rein ou encore le colon (Falkenstein *et al.* 2000; Harvey *et al.* 2001; Lösel & Wehling 2003). Ces effets non génomiques sont mis en œuvre dans les secondes voire les minutes qui suivent la stimulation par l'aldostérone et ne sont pas réprimés par l'action de l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, ni celle du cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, suggérant ainsi que ces effets rapides non génomiques sont indépendants de la transcription et de la traduction (Connell & Davies 2005).

Ils mettent en jeu de nombreuses voies de signalisation telles que la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinase), avec l'activation de seconds messagers tels que l'IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate) ou le Ca^{2+} intracellulaire, qui stimule les kinases PKC et PKD. Ces effets rapides non génomiques varient en fonction du contexte cellulaire et tissulaire (Grossmann & Gekle 2009) et pourraient aboutir dans un deuxième temps à des

modifications de la transcription de gènes. De nombreuses hypothèses ont été émises, telles que la localisation à la membrane du MR (Grossmann *et al.* 2010), l'existence d'un autre récepteur capable de lier l'aldostérone ou bien encore celle reposant sur l'action d'un MR cytosolique.

Le travail de Grossmann *et al.*, a permis de mettre en évidence une colocalisation de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) avec une protéine MR tronquée (comprenant uniquement l'extrémité C-terminale, domaine EF) à la membrane plasmique des cellules musculaires lisses vasculaires. Une exposition longue à des concentrations élevées d'aldostérone provoque une translocation nucléaire du récepteur et la perte de cette colocalisation EGFR/MR à la membrane. Ces observations suggèrent une mobilisation du MR au noyau où il assurerait ses fonctions de facteur de transcription (Grossmann *et al.* 2010) et laissent également supposer une certaine synergie entre les voies génomiques et non génomiques. Mais d'autres travaux suggèrent l'existence d'un effet antagoniste de ces deux voies. En effet, une inhibition du transport de sodium *via* ENaC lors de l'activation rapide des voies ERK1/2 et EGF par l'aldostérone a été mise en évidence (Grossmann *et al.* 2004). De plus, il a été démontré que le MR peut inhiber l'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase vasculaire. Cet effet n'est pas réprimé par les inhibiteurs de la transcription et de la traduction mais uniquement par des antagonistes du MR (éplérénone et RU28318) ou des inhibiteurs de la PKC (Alzamora *et al.* 2003).

La palmitoylation est un mécanisme permettant l'adressage membranaire des protéines. Bien qu'un site de palmitoylation ait été rapporté pour ER (Razandi *et al.* 2003; Marino *et al.* 2006), aucun site n'a été identifié pour le MR. Cette voie ne semble donc pas responsable d'une localisation membranaire du MR. Néanmoins, la mise en évidence récente de l'association du MR avec la cavéoline, une protéine constituant les invaginations de la membrane plasmique (ou cavéoles), suggère une localisation membranaire du MR où il relayerait son action (Callera *et al.* 2011; Igarashi *et al.* 2013). Il a été démontré que l'activation du MR augmente l'expression de la cavéoline-1 et de c-Src (Liang *et al.* 2006; Igarashi *et al.* 2013). Il est intéressant de noter que les cavéolines présentent un site de palmitoylation sur lequel la tyrosine kinase c-Src interagit (Lee *et al.* 2001). C-Src serait impliqué dans les effets non génomiques du MR activé sur la voie des MAP Kinases conduisant notamment à l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) et à la production de ROS (Reactive oxygen species). Ce mécanisme serait important au niveau vasculaire mais une suractivation de cette voie pourrait être à l'origine de lésions inflammatoires (Callera *et al.* 2005, 2011).

L'ensemble de ces données souligne que le rôle de cette voie non génomique rapide n'est pas à ce jour bien caractérisé mais cette voie semble être associée à des situations pathologiques au niveau cardiaque et vasculaire notamment. De nombreuses études semblent, par ailleurs, indiquer que l'activation rapide de la voie c-Src par le MR, la transactivation de EGFR et la phosphorylation de la voie ERK1/2, constituent le point de départ des mécanismes de remodelage au niveau vasculaire et cardiaque (via l'augmentation de synthèse de collagène III) (Weber *et al.* 2003; Grossmann & Gekle 2008).

2.7. Régulation de l'expression et de l'activité du MR

L'expression et l'activité MR sont contrôlées à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. La suite de ce chapitre décrira de manière exhaustive ces différents mécanismes de régulation.

2.7.1. Régulation transcriptionnelle de l'expression du MR

Comme nous l'avons vu précédemment, le gène *NR3C2* (hMR) comporte deux exons (1 et 1'), qui sont transcrits mais non traduits. Ces premiers exons sont épissés de manière alternative dans l'exon 2 et sont à l'origine d'une seule et unique protéine MR. En amont de ces deux premiers exons, se trouvent deux promoteurs fonctionnels, appelés promoteur proximal P1 et promoteur distal P2 (Zennaro *et al.* 1996). Leur conservation inter-espèce suggère un rôle fondamental de ces promoteurs. Par des expériences de transfection transitoire, il a été démontré que le promoteur P1 avait une activité transcriptionnelle basale dix fois plus importante que celle de P2 (Zennaro *et al.* 1996). À l'inverse, l'activité de P2 est dépendante de l'aldostérone. À noter que ces deux promoteurs sont activés par les glucocorticoïdes mais que leur activation ne passe pas par une liaison du GR sur des séquences de type GRE mais probablement par des interactions indirectes protéines/protéines (Zennaro *et al.* 1996). De plus, il a été démontré que les facteurs de transcription Sp1 (Specific Protein 1) et AP-2 (Activator Protein 2) sont capables de se lier aux promoteurs du MR, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation transcriptionnelle du gène MR (Zennaro *et al.* 1996; Pascual-Le Tallec *et al.* 2004). Grâce à une stratégie d'oncogenèse ciblée chez la souris, dans laquelle l'expression de l'antigène T de SV40 (Simian Virus 40) a été placée sous le contrôle du promoteur P1 ou P2, notre équipe a pu démontrer que le promoteur proximal P1 était plus actif que le promoteur distal P2 dans les tissus cibles du MR. Le promoteur P2, dont l'activité transcriptionnelle est plus

faible, pourrait être activé au cours de certaines étapes du développement ou dans certaines situations physiologiques ou pathologiques (Le Menuet *et al.* 2000).

Un rôle du MR dans la régulation autologue de ces promoteurs a également pu être établi. En effet, dans un modèle de cellules souches embryonnaires (ES), notre laboratoire a pu montrer que l'activité de P1 et P2 augmentait au cours de la différenciation neuronale des cellules souches embryonnaires (cellules ES), et que leur activité était corrélée à l'expression du MR et stimulée uniquement par l'aldostérone (Munier *et al.* 2010).

Ces deux promoteurs semblent être impliqués dans des processus physiologiques différents : le promoteur P1, dont l'activité est plus forte que P2, pourrait être qualifié de promoteur constitutif car il permet l'expression basale du MR indépendamment de l'aldostérone. À l'inverse, le promoteur P2, dont l'activité est plus faible et dépendante de la stimulation par l'aldostérone, pourrait être régulé plus finement par cette dernière afin de répondre à des situations spécifiques nécessitant une plus forte expression du MR.

2.7.2. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression du MR

Pendant longtemps, la transcription de l'ADN en ARN a été considérée comme une étape intermédiaire essentielle à l'expression des gènes en protéine mais l'identification des protéines de liaison aux ARN et des microARN en tant que régulateurs de l'expression des transcrits a permis de mettre en lumière l'importance de ce support de l'information représenté par les ARN. Il est maintenant clairement établi que ces acteurs post-transcriptionnels en agissant sur la stabilité et/ou la traduction des transcrits en protéine jouent un rôle primordial dans la régulation de l'expression génique et dans l'adaptabilité rapide des cellules aux changements de leur environnement. Le chapitre 3 sera consacré à la description de ces régulateurs post-transcriptionnels.

La mise en évidence de ces mécanismes de régulation dans le contrôle de l'expression du MR a été rendu possible grâce au modèle de cellules principales rénales KC3AC1 obtenu à partir d'une souris transgénique exprimant l'antigène T de SV40 sous le contrôle du promoteur P1 (Viengchareun *et al.* 2009). Cette lignée cellulaire exprime un MR endogène fonctionnel et ces cellules répondent à une stimulation par l'aldostérone (Viengchareun *et al.* 2009). Nous avons ainsi démontré que le stress osmotique module l'expression du MR. En effet, l'hypertonicité réduit drastiquement l'expression du MR alors que l'hypotonicité l'augmente grâce à des mécanismes post-transcriptionnels, qui font intervenir des protéines de liaison à l'ARN et/ou des microARN (Viengchareun *et al.* 2009). Ces données fournissent des premières explications quant à l'expression différentielle du MR le long du néphron en

faisant un lien fonctionnel notamment entre la tonicité extracellulaire et des mécanismes post-transcriptionnels. Ces mécanismes sont au cœur de mon projet de thèse, ils feront donc l'objet de descriptions plus détaillées dans les prochains chapitres.

2.7.3. Les modifications post-traductionnelles du MR

De nombreuses modifications post-traductionnelles ont été rapportées pour le MR. Il s'agit notamment de la phosphorylation, de l'ubiquitination, de la sumoylation ou bien encore de l'acétylation.

- Phosphorylation

La phosphorylation correspond à l'addition d'un groupement phosphate sur des résidus tyrosines, sérines ou thréonines. Ce mécanisme extrêmement important permet notamment de réguler au sein de la cellule eucaryote, la structure, la localisation, la stabilisation et l'activité de diverses protéines influant le devenir de la cellule. La phosphorylation du MR a été décrite comme étant un mécanisme essentiel à l'activité du récepteur et à sa fixation sur l'ADN après liaison de l'aldostérone (Galigniana 1998; Piwien-Pilipuk & Galigniana 1998; Viengchareun *et al.* 2009; Jimenez-Canino *et al.* 2016).

Ainsi, de nombreuses études ont pu identifier de nombreux sites de phosphorylation du MR au niveau de ses différents domaines fonctionnels. Par exemple, le domaine NTD présente de multiples sites de phosphorylation pour la kinase CDK5 (Cyclin-dependent kinase 5), et le traitement de fortes concentrations d'aldostérone (10 nM) de cellules neuronales corticales favorise l'interaction de CDK5 avec le MR *via* son activateur p35. La phosphorylation des résidus Ser₁₂₈, Ser₂₅₀ et Thr₁₅₉ affecte l'activité transcriptionnelle du récepteur sans jouer sur son accumulation nucléaire (Kino *et al.* 2010). Il a aussi été démontré, chez le rat Brown Norway, que la substitution de la tyrosine en position 73 en cystéine, dans le domaine NTD, conduit à une transactivation plus élevée du récepteur ainsi qu'à son activation partielle par la progestérone, un antagoniste du MR (Marissal-Arvy *et al.* 2004). L'aldostérone conduit également à la phosphorylation rapide du MR par la protéine kinase C de manière à réguler rapidement par des mécanismes non génomiques les transports ioniques, suggérant une interconnexion entre les voies de réponse génomique et non génomique à l'aldostérone (Le Moëllic *et al.* 2004; Faresse *et al.* 2012). Par ailleurs, Faresse *et al.*, ont identifié au niveau du domaine NTD du MR, six sites putatifs de phosphorylation pour les kinases ERK1/2, qui correspondent au motif consensus X-Pro-X1-3-Ser-Pro-X et qui sont fortement conservés entre les espèces. La substitution de six sérines (Ser₁₉₆, Ser₂₂₇, Ser₂₃₈, Ser₂₆₃, Ser₂₈₇ et Ser₃₆₁) en alanine abolit complètement la phosphorylation aldostérone-dépendante du MR (Faresse *et al.* 2010, 2012).

Très récemment, l'importance de la phosphorylation du MR a été démontrée dans les cellules intercalaires rénales avec la phosphorylation de la sérine 843 (présent dans le domaine LBD), qui inactive le MR puisque ce dernier ne peut plus lier l'aldostérone. Cette modification est exacerbée lors d'une hyperkaliémie et de manière opposée, la stimulation par l'angiotensine II et la déplétion volumique entraînent la déphosphorylation du MR via la voie des WNK4 et de la phosphatase PP1 (Protein Phosphatase 1), permettant l'activation du récepteur dans ces cellules (Shibata *et al.* 2013).

L'ensemble de ces études démontre l'importance de cette modification post-traductionnelle pour la conformation de la protéine (Hirschberg *et al.* 2004), sa localisation subcellulaire (Walther *et al.* 2005), son activation par l'aldostérone (Faresse *et al.* 2010, 2012) mais aussi pour son activité transcriptionnelle. Ces modifications post-traductionnelles peuvent être mises en jeu dans certaines situations pathologiques comme dans lors d'une hyperkaliémie (Shibata *et al.* 2013).

- Ubiquitination

L'ubiquitination correspond au greffage covalent sur une protéine cible, d'une ou plusieurs ubiquitine (8 kDa) au niveau d'un résidu lysine. La protéine cible peut être mono- ou poly-ubiquitinée. Cette modification post-traductionnelle nécessite l'action séquentielle de trois enzymes : l'enzyme E1 active l'ubiquitine avant son attachement protéique, puis la ligase de conjugaison E2 lie l'ubiquitine sur un résidu lysine de la protéine ciblée. Enfin, l'ubiquitine-ligase E3 permet la spécificité du greffage de l'ubiquitine (Kerscher *et al.* 2006; Weissman *et al.* 2011). Les protéines ubiquitinées sont dégradées par le protéasome ou le lysosome. Comme la phosphorylation, l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle réversible grâce à l'action de désubiquitinases, qui sont capables d'hydrolyser la liaison de l'ubiquitine sur la protéine substrat.

Les travaux de Yokota *et al.*, ont démontré que la stimulation par l'aldostérone réduisait l'expression du MR et que l'inhibition du protéasome reversait ce résultat mettant en lumière des mécanismes de dégradation du MR associés à l'ubiquitination du récepteur (Yokota *et al.* 2004). A l'état basal, le MR est mono-ubiquitiné. Cet état est maintenu par son interaction avec TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101) mais la phosphorylation du MR par ERK1/2 réduit cette interaction conduisant à une désubiquitination du MR et permet la poly-ubiquitination du MR ainsi que l'accélération de sa dégradation (Faresse *et al.* 2012). Il a par ailleurs été suggéré que le MR serait ubiquitiné de façon dynamique, puis dégradé par le protéasome afin de réguler son activité (Tirard *et al.* 2007). Cette régulation dynamique pourrait également permettre le maintien d'un pool fixe de protéine MR. Un autre mécanisme pourrait conduire à la dégradation du MR via l'action de la protéine USP2-45 (Ubiquitin-

Specific Protease 2-45), qui en diminuant la ubiquitination du MR, augmenterait sa sensibilité à la poly-ubiquitination et donc à l'action de la machinerie de dégradation (Faresse 2014). Néanmoins, l'absence d'identification précise des sites de poly-ubiquitination sur le MR ne permet pas d'établir clairement la relevance physiologique de la ubiquitination.

- Sumoylation

La sumoylation est une autre modification post-traductionnelle, se caractérisant par le greffage covalent d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) sur une protéine cible au niveau d'une lysine acceptrice. Quatre protéines SUMO ont été identifiées et caractérisées, elles sont numérotées de 1 à 4. Comme pour la ubiquitination, la sumoylation se fait en trois étapes enzymatiques successives (E1 > E2 > E3) et nécessite l'action de trois SUMO-ligases différentes. Pour la majorité des lysines sumoylées, le résidu est contenu dans une séquence consensus de type KXD/E où correspond à un résidu aliphatique, K à la lysine cible, D à l'acide aspartique et E à l'acide glutamique alors que X désigne n'importe quel résidu. Le MR présente le plus grand nombre de sites de sumoylation au niveau du domaine AF-1 (NTD) par comparaison aux autres récepteurs stéroïdiens, à l'exception de ER (Pascual-Le Tallec & Lombès 2005). Ces sites sont localisés dans les domaines AF-1a et AF-1b du domaine NTD (Lys₈₉, Lys₃₉₉, Lys₄₂₈, Lys₄₉₄) et dans le LBD (Lys₉₅₃) (Tallec *et al.* 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, deux corégulateurs du MR sont capables de sumoyler le MR : le corépresseur PIAS1 (E3-ligase) (Tallec *et al.* 2003) et le coactivateur Ubc9 (E2-conjugating enzyme) (Tirard *et al.* 2007; Yokota *et al.* 2007). Leur action entraîne des effets opposés sur la transcription des gènes cibles du MR. Une conservation de ces sites de sumoylation au cours de l'évolution est constatée. En effet, ces sites ont été identifiés également chez le Xénope (Tallec *et al.* 2003), ce qui souligne leur importance mais, à ce jour, la relevance physiologique de ce type de modification post-traductionnelle n'a pas encore été clairement établie.

- Acétylation

Pendant de nombreuses années, l'acétylation du MR a été supposée par analogie avec les autres récepteurs stéroïdiens pour lesquels cette modification post-traductionnelle a clairement été établie. Ce n'est qu'assez récemment que l'acétylation du MR a été mise en évidence, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de désacétylases. Lee *et al.*, ont démontré que l'acétylation du MR inhibe son activité transcriptionnelle. Ainsi, l'inhibition de la désacétylation du MR augmente son acétylation sur la lysine en position 677 (région charnière) et empêche le recrutement de l'ARN Pol II sur le promoteur des gènes cibles (Lee *et al.* 2013). Ces observations ont été confirmées *in vitro* et *in vivo* sur le modèle de rat Sprague-Dwaley après néphrectomie unilatérale et traitement par de l'acétate de

désoxycorticostérone et une solution de NaCl (1% dans l'eau de boisson). Dans ces conditions, la pression artérielle est augmentée ainsi que l'activité du MR. Les inhibiteurs des désacétylases préviennent ces effets en réduisant l'activité transcriptionnelle du MR. Ces résultats démontrent le bénéfice de la désacétylation du MR après exposition aux agonistes du MR suggérant un rôle physiologique de cette modification post-traductionnelle dans ce contexte.

2.8. Le MR en physiopathologie humaine

L'importance du MR en physiologie a pu être démontrée lors de l'inactivation du gène *Nr3c2* chez la souris, qui entraîne la mort des souriceaux par une déshydratation massive causée par une perte urinaire de sodium, 8 jours après la naissance (J8) (Berger *et al.* 1998). Ceci a également été démontré par les travaux de l'équipe sur l'expression rénale du MR à la naissance. En effet, nous avons mis en évidence chez les nouveau-nés une perte de sodium ainsi qu'une hyperkaliémie. A l'inverse, nous avons pu observer des taux plasmatiques élevés de aldostérone et de rénine attestant d'une activation du système SRAA actif et fonctionnel, malgré la résistance partielle à l'aldostérone. L'étude de l'expression du MR dans la période périnatale a démontré une expression rénale basse ou nulle à la naissance ainsi qu'une absence d'expression de la 11 HSD2 essentielle à la sélectivité minéralocorticoïde. L'ensemble de ces travaux, met en évidence chez le nouveau-né, que la résistance partielle à l'aldostérone observée durant la période périnatale est intimement liée à l'expression rénale du MR très basse ou nulle à la naissance (Martinerie *et al.* 2009a, b). Ce tableau rappelle notamment l'aploinsuffisance du MR des patients porteurs de mutations inactivatrices du MR dans la forme autosomale dominante du « pseudohypoaldostéronisme de type 1 » ou PHA1 (Geller *et al.* 1998; Sartorato *et al.* 2004).

Le PHA1 est une maladie génétique rare, décrite pour la première fois par Cheek et Perry en 1958 (Cheek & Perry 1958). Deux formes de cette pathologie ont été identifiées : elles se distinguent déjà par leur origine génétique mais aussi par leur tableau clinique. Une première forme dite autosomale dominante (adPHA1) est qualifiée également de forme rénale alors qu'une deuxième forme autosomale récessive (arPHA1), ou forme systémique a été proposée. Les patients atteints de PHA1 présentent, dans les premiers mois de vie, une perte de sodium associée à une déshydratation, un retard de croissance, une hyperkaliémie ainsi qu'une acidose métabolique et une résistance partielle à l'aldostérone (Geller 2005; Zennaro *et al.* 2012). La forme systémique se traduit par une perte de sodium plus sévère au niveau du rein, du colon, des glandes salivaires et sudoripares (Hanukoglu

1991). Des mutations homozygotes et hétérozygotes des sous-unités de ENaC ou du MR sont responsables du développement de la maladie (Zennaro *et al.* 2012; Rossier *et al.* 2013).

Actuellement, 50 mutations hétérozygotes réparties sur l'ensemble du gène *NR3C2* ont été identifiées chez des patients atteints de PHA1 et aucune mutation homozygote référencée, cette dernière étant probablement létale par analogie aux modèles animaux de Berger et Bleich (Geller *et al.* 1998, 2006; Pujo *et al.* 2007; Zennaro *et al.* 2012) (Berger *et al.* 1998; Bleich *et al.* 1999). Récemment, 2 mutations hétérozygotes du MR ont été associées à la forme récessive de la pathologie (Hubert *et al.* 2011). Ce grand nombre de mutations peut expliquer en partie les différences phénotypiques observées chez les patients. En effet, les travaux de Fernandes-Rosa *et al.*, montrent une différence des niveaux d'expression des gènes cibles des récepteurs MR mutés, ces derniers présentant une sensibilité à l'aldostérone totalement différente. Ils ont également démontré que ces mutations causent un changement tridimensionnel du récepteur modifiant ses propriétés transcriptionnelles (Fernandes-Rosa *et al.* 2011).

Il est intéressant de constater que l'haploinsuffisance du MR suffit au développement du phénotype PHA1, ceci a notamment été démontré lors de l'analyse génétique d'une famille sur trois générations et suggère que la diminution de l'expression rénale du MR a de graves conséquences sur sa fonction dans le transport de sodium et ce particulièrement lors de la période néonatale (Geller *et al.* 2006). Par ailleurs, une récente étude a démontré que l'absence d'expression du MR chez la souris entraîne une baisse d'expression au niveau du transcrit ENaC, cible génomique du MR, 5 jours après la naissance, contribuant au développement du tableau de PHA1 (Zhang *et al.* 2013).

A l'opposé, l'hyperactivation de la voie de signalisation minéralocorticoïde conduit à des effets délétères chez l'homme, telle que la rétention sodée, l'expansion volémique et l'hypertension artérielle ; ces effets concourent à terme à une atteinte rénale (fibrose et protéinurie) (Quinkler *et al.* 2005). Les travaux précédents de l'équipe ont, par ailleurs, démontré que la surexpression du MR chez la souris conduit à un phénotype rénal (dilatation tubulaire, réduction de la kaliurie) et cardiaque (cardiomyopathie dilatée modérée, tachyarythmie) (Le Menuet *et al.* 2001). Les antagonistes du MR ont, quant à eux, démontré leurs effets bénéfiques sur l'amélioration et la prévention de la fibrose rénale et cardiaque, confirmant l'implication majeure du MR en physiopathologie (Lam *et al.* 2006) notamment au cours d'études cliniques (RALES, EPHESUS et EMPHASIS) où le bénéfice des antagonistes du MR, chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère ou modérée, a pu être prouvé. En effet, le traitement par ces antagonistes réduit significativement la

morbidity et la mortalité induite par l'insuffisance cardiaque et en post-infarctus (Pitt *et al.* 1999, 2003; Zannad *et al.* 2011). Ces observations ont permis une nette avancée dans la prise en charge thérapeutique de ces maladies cardiovasculaires. De nouvelles études cliniques sont actuellement en cours afin de déterminer un bénéfice potentiel des antagonistes du MR dans le cadre des infarctus du myocarde (REMINDER) et la préservation de la fraction d'éjection lors d'une insuffisance cardiaque (essai TOPCAT) (Montalescot *et al.* 2014; Pfeffer *et al.* 2015).

De plus, l'utilisation d'une stratégie d'interférence ARN anti-MR chez le rat prévient le développement d'hypertension artérielle et l'atteinte rénale (Wang *et al.* 2006). De nombreuses études démontrent le rôle prépondérant de l'aldostérone et du MR dans le développement des maladies cardiaques et de l'hypertension. La revue de Lothar et Hein propose d'ailleurs l'implication du MR vasculaire dans le remodelage cardiaque et celle du MR exprimé dans les cellules endothéliales dans le développement de l'inflammation (Lothar & Hein 2016). A ce jour, une seule mutation activatrice du MR a été identifiée : il s'agit de la mutation S810L, qui est notamment responsable d'une hypertension artérielle héréditaire, sévère et précoce et qui s'aggrave au cours de la grossesse (Geller *et al.* 2000). La localisation de cette mutation au niveau du LBD change la conformation de la poche hydrophobe liant le ligand et modifie la spécificité du récepteur qui est alors activé par des antagonistes du MR tels que la progestérone, la cortisone, la 11-déhydrocorticostérone mais aussi par la spironolactone. De plus, cette mutation génère un MR mutant constitutivement actif (Geller *et al.* 2000; Rafestin-Oblin *et al.* 2003; Pinon *et al.* 2004). Les travaux de Ramirez-Salazar *et al.*, ont par ailleurs cherché à établir un lien entre la mutation S810L du MR et un polymorphisme de l'aldostérone synthase pouvant être impliqué dans la baisse de l'aldostérone plasmatique observée chez les femmes enceintes hypertendues. L'analyse génétique du MR sur deux cent femmes enceintes révèle que la fréquence de la mutation S810L est quasi similaire chez les femmes hypertendues et normotendues (12% vs 9,4%), cette fréquence allélique est pour le moins inattendue dans la mesure où une mutation homozygote n'a été jusqu'à présent identifiée que dans une seule famille dans le monde. L'analyse du polymorphisme C/T de CY11B2, qui est associé à une réduction de synthèse d'aldostérone, n'a pas permis d'établir un lien avec la mutation MR S810L et le développement de l'hypertension gestationnelle (Ramirez-Salazar *et al.* 2011). Ces observations suggèrent l'implication d'autres facteurs dans le développement de cette pathologie.

Récemment, un lien entre inflammation, fibrose tissulaire et le MR par l'intermédiaire de son gène cible Sgk1 a été mis en évidence. En effet, la surexpression de Sgk1 a été rapportée dans des fibroses tissulaires ou des néphropathies glomérulaires, cette dernière stimulant

l'expression de médiateurs de l'inflammation. Il a également été démontré que l'excès de minéralocorticoïdes et de sels, en stimulant l'expression de Sgk1, augmente le risque de développer des maladies auto-immunes *via* la génération de lymphocytes auxiliaires (T_H17) (Kleinewietfeld *et al.* 2013; Amador *et al.* 2014; Artunc & Lang 2014). Le rôle joué par Sgk1 dans le développement de fibrose tissulaire lors d'un excès de minéralocorticoïdes et de sel a notamment été démontré dans des modèles animaux n'exprimant plus une kinase fonctionnelle. L'absence de Sgk1 protège alors de manière notable, ces animaux contre le développement de fibrose cardiaque et rénale (Artunc *et al.* 2006; Vallon *et al.* 2006). La kinase Sgk1 participe notamment au développement de la fibrose tissulaire grâce à son activité répressive sur Nedd4L qui prévient normalement la dégradation des facteurs de transcription Smad2/3 augmentant ainsi les effets du facteur profibrotique TGF (Lang & Stournaras 2013).

L'activation inappropriée du MR par l'aldostérone provoque le développement de processus inflammatoires et la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ceci est exacerbé après une charge sodée importante et entraîne des conséquences visibles pour l'organisme (hypertension, hypertrophie du cœur, du rein et des vaisseaux, fibrose, sur-activation du système nerveux sympathique) (Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez 2014). De plus, il a été démontré dans plusieurs études, le caractère bénéfique des antagonistes du MR qui bloquent ou reversent l'inflammation des tissus (Artunc & Lang 2014). L'inflammation peut également être prévenue par l'action d'inhibiteurs de la NADPH oxydase, ceux des espèces réactives de l'oxygène et les antagonistes du TNF (tumor necrosis factor) (Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez 2014).

De nombreux travaux ont enfin mis en évidence le rôle délétère de l'aldostérone et du MR dans le cadre de maladies métaboliques telles que le syndrome métabolique ou le diabète (Whaley-Connell *et al.* 2010). Comme énoncé dans le chapitre 2.5, le MR qui est aussi exprimé au niveau du tissu adipeux, y assure de nouvelles fonctions. Il est impliqué dans la plasticité des adipocytes blancs, dans les phénomènes de « beiging » (Armani *et al.* 2014) et dans la différenciation adipocytaire (Caprio *et al.* 2007). L'utilisation de modèles animaux obèses (*db/db*, *ob/ob*, ou soumis à un régime riche en lipides) a également permis de confirmer ces nouveaux rôles. On peut citer le travail de Guo *et al.*, qui a démontré la baisse des effets délétères causés par l'obésité grâce à l'utilisation de piéronone, un antagoniste du MR. Les auteurs ont notamment observé, après 16 jours de traitement, une baisse de l'expression des adipokines pro-inflammatoires et des facteurs pro-thrombotiques (TNF, PAI-1, Plasminogen Activator-Inhibitor-1) mais aussi l'augmentation de l'adiponectine, et de PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma), un facteur de transcription majeur de l'adipogenèse (Guo *et al.* 2008; Hirata *et al.* 2009). Plus récemment, d'autres

travaux ont démontré par une surexpression du MR cellule-spécifique dans les adipocytes, que l'augmentation de son expression mime les effets observés au niveau du tissu adipeux dans les modèles animaux d'obésité et rappelle également le tableau clinique du syndrome métabolique (augmentation du poids, insulino-résistance) (Urbanet *et al.* 2015).

Le syndrome métabolique est une pathologie associant obésité abdominale, insulino-résistance, dyslipidémie, hyperglycémie ainsi qu'une pression artérielle élevée (Cornier *et al.* 2008). Plusieurs facteurs sont responsables du développement de cette pathologie telle que l'accumulation ectopique de lipides gras (muscle et foie), une altération de la fonction endocrine du tissu adipeux et une infiltration macrophagique (Després & Lemieux 2006). De plus, le rôle récemment décrit du MR dans la polarisation des macrophages par notre équipe et d'autres, permettent de souligner aujourd'hui l'importance du MR dans le métabolisme énergétique (Toubal *et al.* 2013; Kuhn *et al.* 2014).

L'ensemble de ces données apporte des arguments en faveur du rôle majeur joué par l'altération de l'expression du MR sur le développement de pathologies variées et souligne l'importance d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'expression du MR afin de développer de nouvelles stratégies interventionnelles.

3. Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle

La stabilité des transcrits et leur traduction sont deux événements interdépendants contrôlés par des protéines de liaison à l'ARN (ou RNA-Binding Protein, RBP) ou par des microARN (miARN) (Bartel 2004; Glisovic *et al.* 2008). Il est maintenant établi que l'interconnexion de ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle (Figure 12) dans le contrôle de l'expression des transcrits influence la majorité des processus biologiques en permettant à la cellule de répondre à un besoin ou à un stress spécifique (Keene 2007; Glisovic *et al.* 2008). Dans ce contexte, le dérèglement de ces mécanismes précis conduit au développement de pathologies graves (cancers, maladie de Parkinson, cardiomyopathies, diabète, syndrome du X fragile) (Wang *et al.* 2012; Ciafrè & Galardi 2013). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes interrogés sur l'impact potentiel de ces mécanismes dans le contrôle de l'expression rénale du MR.

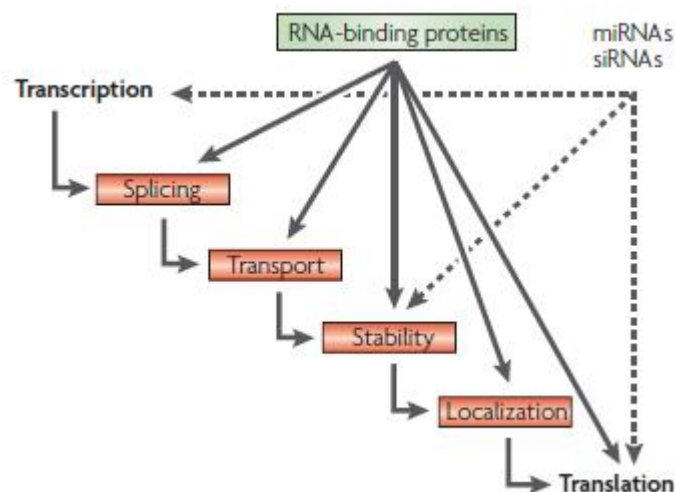


Figure 12 : Interconnexion des mécanismes post-transcriptionnels influençant le devenir des transcrits.

Dès sa transcription, un transcrit est soumis à différentes étapes de régulation assurées par des protéines de liaison à l'ARN et ou des petits ARN non codants (miARN et siARN). Ces étapes sont cruciales pour le devenir du transcrit. En effet, son niveau d'expression ou l'activité du produit de traduction peut être considérablement modifié par l'action des RBP, des siARN ou de miARN. (D'après Keene, 2007).

3.1 Les protéines de liaison à l'ARN

Ce sont des protéines capables de se fixer sur des transcrits spécifiques. Elles régulent leur demi-vie et jouent un rôle déterminant dans le devenir des ARN messagers en influant sur leur biosynthèse, leur stabilité, leur fonction, leur transport, leur localisation cellulaire ou encore sur leur traduction (Figure 12).

Deux types de RBP ont ainsi été identifiés : le premier type regroupe les protéines de liaison à l'ARN dites déstabilisatrices qui, en se liant à leurs transcrits cibles, permettent le recrutement de la machinerie de dégradation des ARN (désadénylases, ribonucléases) (Glisovic *et al.* 2008). Le deuxième type de RBP est composé de RBP stabilisatrices, qui augmentent la demi-vie des transcrits cibles en prévenant leur dégradation et en favorisant leur traduction pour augmenter l'expression de la protéine correspondante (Hinman & Lou 2008).

3.1.1 Classification structurale des protéines de liaison par leurs domaines de liaison à l'ARN

On dénombre principalement trois domaines de liaison à l'ARN retrouvés sur les RBP : le domaine RRM pour RNA Recognition Motif, le doigt de Zinc (ZnF), et le domaine KH (*K Homology domain*). Un autre domaine a été également décrit ; il s'agit du domaine de liaison à l'ARN double brin, qui est retrouvé dans les protéines intervenant dans les processus de « RNA processing » ou lors de la maturation des miARN.

a) Le Motif de Reconnaissance des ARN ou RNA Recognition Motif (RRM)

Le domaine RRM est le plus fréquent des domaines de liaison à l'ARN chez les vertébrés. C'est également le plus représenté d'après l'étude *in silico* de Letunic (Letunic *et al.* 2009). Ce domaine est également capable d'interagir avec des protéines (Fribourg *et al.* 2003). Le domaine RRM, d'une taille comprise entre 80 et 90 acides aminés, est composé de 4 feuillets antiparallèles et de 2 hélices. Il a été initialement identifié par Dreyfuss *et al.* dans les années 80 (Dreyfuss *et al.* 1988). La structure particulière 1 1 2 3 2 4 confère une grande flexibilité au domaine, qui est capable d'adopter différentes conformations pour lier un transcrit. L'interaction avec les ARN se fait au niveau des feuillets centraux 2 et 3, plus spécifiquement *via* les motifs RNP1 (feuille 2) et RNP2 (feuille 3), qui sont formés par des résidus Arginines/Lysines conservés ; ces motifs permettent l'établissement d'un pont salin avec l'ARN. Ce domaine RRM est capable de reconnaître une séquence particulière de 4 à 8 nucléotides et la répétition de ces séquences renforce la liaison aux ARN (Maris *et al.* 2005). Ce domaine est retrouvé dans plusieurs RBP telles que les protéines SR (Sérines/Arginines), les hnRNP (Heterogeneous RNP ribonucleoprotein) et les membres de la famille des protéines Hu/ELAV (Hu Antigen/ Embryonic Lethal Abnormal Vision).

b) Le domaine en doigt de Zinc ou Zinc Finger (ZnF)

Ce domaine, comportant 20 et 30 acides aminés, est formé de deux feuillets β et d'une hélice α (), comprend un atome de zinc ou métallique (cuivre ou fer) contenu dans une « poche » formée par l'association d'une hélice et . Ce domaine est souvent présent en plusieurs copies pour fixer les ARN (Hall 2005). En fonction du type de résidus liant l'atome de zinc, trois types de domaine peuvent être distingués. Ainsi, il existe la famille des CCHH, qui correspond à deux cystéines suivies par deux histidines, la famille des CCCH ou C3H1, qui présente 3 cystéines suivi d'une histidine et enfin la famille CCCC, possédant 4 cystéines. Ces motifs ont été initialement décrits comme liant l'ADN. Le domaine en doigt de zinc est capable de reconnaître et de lier différentes séquences ribonucléotiques. La conformation CCCH lie préférentiellement l'ARN au niveau des séquences ARE (AU Rich Elements), riches en Adénosines et Uraciles. Ce domaine en doigt de zinc est notamment présent sur les protéines de liaison à l'ARN de la famille des Tis11 (Baou *et al.* 2009).

c) Le domaine KH ou hnRNP K Homology domain (KH)

Ce domaine, d'environ 70 acides aminés, est capable de lier aussi bien l'ADN simple brin que l'ARN (Valverde *et al.* 2008). Ce dernier est composé de 3 feuillets et de 3 hélices qui, en fonction de leur organisation structurale, peut être classé en deux groupes. Le type I, retrouvé chez les eucaryotes, présente une topologie et se caractérise par 3 brins antiparallèles entourés par les hélices . Le type II, plutôt rencontré chez les procaryotes, possède au contraire la topologie . Ces deux domaines présentent un motif commun nommé KH minimal () ainsi qu'une boucle GXXG entre les deux hélices . La reconnaissance spécifique de 4 nucléotides sur le transcrit est possible grâce à une zone d'interaction formée par les hélices , la boucle GXXG, un feuillet et une deuxième boucle variable. La fixation sur l'ARN de ce domaine est possible grâce à la formation de liaisons hydrophobes, hydrogènes et électrostatiques. Ce domaine est présent dans les protéines RBP, Nova et FRMP (Glisovic *et al.* 2008; Valverde *et al.* 2008).

d) Le domaine de liaison à l'ARN double brin ou doubled-stranded RNA Binding Domain (dsRBD)

Ce domaine de 70 à 90 acides aminés présente une structure topologique de type (Doyle & Jantsch 2002). Contrairement aux autres domaines précédemment décrits, ce

dernier ne lie aucune séquence particulière mais est capable de se lier au niveau des extrémités 2'OH du squelette phosphate des ARN. Les protéines présentant ce type de motif sont impliquées dans les mécanismes d'édition de l'ARN comme ADAR2 ou encore dans les mécanismes d'ARN interférence comme par exemple Dicer.

3.1.2. Présentation et classification des sites de fixation des protéines de liaison à l'ARN

Les ARE, pour Adenosine-Uridine-Rich Elements ou AU-Rich Elements, sont des motifs déterminants pour la régulation des transcrits par les RBP et le renouvellement des ARNm. Les ARE peuvent ainsi être qualifiés de séquences cis-régulatrices des ARNm labiles. Ils sont retrouvés principalement au niveau des régions 3'non traduites ou 3'UTR des transcrits cibles. Ces motifs pentamériques de type AUUUA sont composés d'Adénosines et d'Uridines. Ils sont classés en fonction de leur fréquence et de leur positionnement. Ainsi, trois classes ont été définies, d'après Chen et al. (Chen & Shyu 1995) :

- Classe I : motifs AUUUA isolés ou non chevauchants (un à trois)
- Classe II : motifs AUUUA chevauchants au niveau des régions riches en U. Ce groupe est subdivisé en 5 sous-groupes classés de A à E en fonction du nombre de pentamères dénombrés
- Classe III : ne présente pas de motifs pentamériques mais des séquences riches en Uridines

Il est important de noter que la présence d'une classe d'ARE sur un transcrit ne permet pas de prédire les RBP impliquées dans les mécanismes post-transcriptionnels, qui régulent la stabilité de ce transcrit.

3.1.3. Les protéines de liaison à l'ARN

A ce jour, plus d'un millier de protéines capables de se lier au ARN ont été caractérisées (Gerstberger *et al.* 2014; Neelamraju *et al.* 2015). Dans le paragraphe suivant, je présenterai quelques exemples représentatifs de RBP connues pour se lier aux motifs ARE et assurant également une fonction de contrôle de l'expression des transcrits.

a) La famille des TIS11

TIS11 signifie 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-inducible sequence 11. L'expression des membres de cette famille peut notamment être induite par le TPA. En effet, son expression basale est relativement faible et un stimulus (mitogènes, insuline, stress cellulaire) augmente rapidement (15 min) l'expression de son transcrite et son activation en induisant sa phosphorylation (Baou *et al.* 2009). Cette famille présente trois membres qui sont exprimés chez l'homme : Tis11 (TTP, Zfp36, Nup475, GOS24), Tis11b (Zfp36L1, Berg36, ERF-1, BRF-1) et Tis11d (Zfp36L2, ERF-2, BRF-2). Plus récemment, un quatrième membre, exprimé uniquement chez les rongeurs, a été appelé Zfp36L3. Ces protéines lient l'ARN grâce aux multiples motifs à doigt de zinc et à leur domaine C-terminal. Elles interagissent physiquement avec les motifs ARE de type pentamérique AUUUA. Il est aussi intéressant de noter que les membres de cette famille peuvent lier des transcrits ne présentant pas de motif ARE. Par exemple, Emmons *et al.*, ont démontré la liaison de TTP/Tis11 à des motifs CTTGTG (Emmons *et al.* 2008). De plus, une analyse du génome a révélé que la majorité des transcrits cibles de TTP/Tis11 n'a pas de motifs ARE (Stoecklin *et al.* 2008). Les protéines TIS sont également capables de changer rapidement de localisation subcellulaire pour assurer leur fonction déstabilisatrice au niveau cytoplasmique, grâce notamment à un mécanisme d'export dépendant de CRM1 et de signaux d'export nucléaire (Phillips *et al.* 2002). De plus, elles possèdent une séquence NLS fonctionnelle, qui est localisée entre deux doigts de zinc.

Afin d'accélérer la dégradation des transcrits, ces RBP recrutent des désadénylases, des enzymes de décoiffage, des exonucléases ou encore des protéines appartenant à l'exosome *via* leur domaine N-terminal (Figure 13) (Lykke-Andersen & Wagner 2005). La faible homologie entre les membres de cette famille permet une certaine spécificité pour leurs cibles et explique l'absence de redondance entre les phénotypes observés après invalidation ciblée des gènes codant les protéines TIS11 (Taylor *et al.* 1996; Stumpo *et al.* 2004, 2009; Bell *et al.* 2006).

L'action des kinases p38/MAPK et MK2 (p38/Mitogen-Activated Protein Kinase et MAP kinase-activated protein Kinase 2) sur les nombreux sites de phosphorylation, permet de moduler la localisation subcellulaire, l'activité mais également l'expression des protéines TIS (mécanismes de dégradation). De plus, les protéines de la famille TIS11 sont également capables de s'autoréguler négativement *via* les motifs ARE localisés dans leurs régions 3q UTR (Brooks *et al.* 2004).

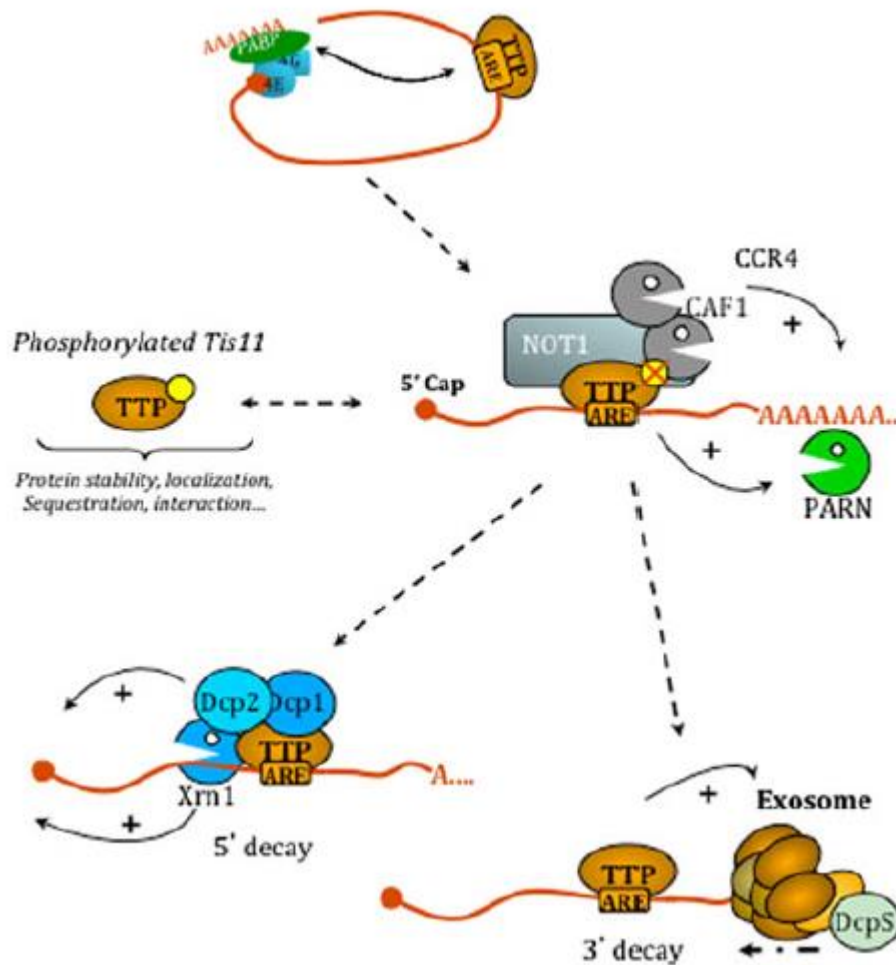


Figure 13 : Mécanisme de dégradation des ARNm initié par les protéines de la famille TIS11.

Après reconnaissance et fixation du transcrite cible, la protéine TTP/Tis11 en interagissant avec PAPB (poly(A)-Binding Protein) inhibe son action protectrice sur la queue poly A. Cette dernière devient alors sensible à la dégradation après désadénylation. Le recrutement des désadénylases s'effectue directement *via* le complexe CCR4-CAF1-NOT1 ou indirectement *via* la protéine PARN. Une fois désadénylé, le transcrite est dégradé par le complexe protéique exosomal, ce dernier possédant une activité exonucléasique 3q5q Le transcrite peut également être dégradé après élimination de la coiffe en 5qpar Dcp1/Dcp2 et laction de lexonucléase 5q3qXrn1. (Daprès Ciais *et al.* 2012)

b) La protéine AUF1 ou ARE/poly(U)-binding/degradation Factor 1

Précédemment nommée hnRNP D, elle a été renommée AUF1 (Brewer 1991; Zhang *et al.* 1993). Quatre isoformes de la protéine AUF1 sont générées par le splicing alternatif du pre-ARN messager de AUF1. Des phénomènes d'inclusion ou d'exclusion des exons 2 et/ou 7 conduisent à l'apparition de ces quatre variants d'une taille variant entre 19 et 49 acides aminés. Ces derniers sont nommés en fonction de leur poids moléculaires : p45^{AUF1}, p42^{AUF1}, p40^{AUF1} et p37^{AUF1}. Toutes ces isoformes présentent deux motifs RRM organisés en tandem ainsi qu'un motif riche en glutamine de 8 acides aminés dans la région C-terminale du RRM2. Elles ne présentent pas la même localisation subcellulaire. En effet, les variants p45^{AUF1}, p42^{AUF1} sont nucléaires alors que les autres variants ont une localisation nucléocytoplasmique. Pour assurer leur action déstabilisatrice sur le transcrite, ces derniers sont capables de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce à des séquences d'export et d'import nucléaire (Sarkar *et al.* 2003). Une fois dans le cytoplasme, ces variants s'associent sous forme de dimères pour reconnaître et fixer leurs transcrits cibles. Elles sont capables de lier des transcrits ayant des motifs AUUUA ou polyU avec la même affinité (Wilson *et al.* 1999, 2001b).

En plus de leurs fonctions déstabilisatrices sur les ARNm, les protéines AUF1 sont aussi capables de stabiliser certains transcrits. En effet, AUF1, précédemment décrite comme responsable de la diminution de la stabilité de certains transcrits impliqués dans le cycle cellulaire (p16^{INK4a}, cycline D1) ou dans la réponse inflammatoire (TNF , Il) (Gratacós & Brewer 2010; Zucconi & Wilson 2011), est aussi capable de stabiliser le transcrite de l'hormone parathyroïdienne (Sela-Brown *et al.* 2000). De plus, le travail de Mazan-Mamczarz a confirmé cette dualité de rôle pour AUF1 par une approche moyen débit sur ses transcrits cibles (Mazan-Mamczarz *et al.* 2009).

AUF1 subit également différents processus de régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle affectant son expression et son activité. Ainsi, la phosphorylation de AUF1 inhibe sa liaison aux transcrits cibles alors que l'hyperphosphorylation par NPM-A-ALK renforce son interaction avec ses cibles. Par ailleurs, sa dégradation est sous le contrôle de la voie ubiquine-protéasome (Laroia & Schneider 2002).

c) La famille des protéines Hu

Originellement identifiée chez la drosophile ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision), cette famille de protéines se compose de quatre membres HuR (ELAV1, HuA), HuB (ELAV2), HuC (ELAV3) et HuD (ELAV4) (Ma *et al.* 1996; Antic & Keene 1997). HuR est exprimé de manière ubiquitaire alors que l'expression des trois autres membres de la famille est limitée

aux tissus neuronaux (une exception peut être faite pour HuB, qui est aussi exprimé dans les gonades) (Hinman & Lou 2008). Ces protéines, d'environ 90 acides aminés, présentent trois domaines de type RRM ; les deux premiers domaines sont localisés dans la partie N-terminale alors que le dernier se situe dans la partie C-terminale. Les trois RRM sont séparés par une région charnière ou « hinge region », qui joue un rôle essentiel avec les RRM1 et RRM2 dans la reconnaissance et la fixation des transcrits. Le domaine RRM3 serait, quant à lui, important pour le maintien de la stabilité du complexe ARN/RBP. HuR est localisé dans le noyau, les autres membres sont principalement cytoplasmiques (Gao & Keene 1996).

La protéine HuR est le membre de la famille Hu, le plus étudié, et apparaît comme un régulateur clé de la réponse cellulaire aux changements environnementaux. La protéine HuR intervient dans de nombreux processus biologiques (cycle cellulaire, activation des cellules immunitaire, carcinogenèse) grâce à sa fonction stabilisatrice des ARNm (Brennan & Steitz 2001; López de Silanes *et al.* 2004). HuR effectue une navette entre le noyau et le cytoplasme en réponse à un signal extracellulaire afin d'assurer sa fonction stabilisatrice. Cette navette nucléo-cytoplasmique est en partie contrôlée par la présence d'une séquence d'export localisée dans la région charnière nommée HNS pour HuR Nuclear Shuttling Sequence (Fan & Steitz 1998). L'export nucléaire correspond, dans certains cas, à un mécanisme d'export dépendant de la voie CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) (Fries *et al.* 2007). Une fois dans le cytoplasme, les protéines Hu interagissent avec leur transcrite cible au niveau de motifs ARE ou riches en U. Les protéines Hu protègent le transcrite de la dégradation, et augmentent sa durée de vie ainsi que le recrutement de la machinerie transcriptionnelle afin d'accroître l'expression du produit du gène. En dehors de son action stabilisatrice, de nombreuses fonctions de HuR ont été mises en évidence sur la régulation des transcrits. Ainsi, HuR est capable d'agir sur l'épissage alternatif et l'efficacité de la traduction des transcrits (Doller *et al.* 2008; Srikantan & Gorospe 2012).

L'expression et l'activité de HuR peuvent être modulées à plusieurs niveaux. Ainsi, une régulation positive par la voie NF- κ B (Jeyaraj *et al.* 2010) ou par la voie PI3K/AKT/NF- κ B a été décrite dans le tubule rénal (Singh *et al.* 2013). De plus, la protéine HuR est connue pour sa capacité d'autorégulation permettant d'augmenter son expression (Al-Ahmadi *et al.* 2009). Des mécanismes de régulation négative de HuR existent également : ils impliquent notamment les microARN miR-519, miR-16 et miR-125a, qui sont connus pour inhiber l'expression de HuR. La protéine HuR est également ubiquitinylée afin d'accélérer sa dégradation. De plus, la protéine HuR subit des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation (Chk2, Cdk1, PKC, δ) ou la méthylation (CARM1), qui module sa localisation et sa capacité à lier ses cibles (Srikantan & Gorospe 2012). Il est intéressant de

noter que les RBP stabilisatrices telles que HuR et déstabilisatrices (comme dans la famille TIS11) sont capables d'entrer en compétition pour fixer le même transcrite. Nous aborderons plus loin les notions de compétition et de dialogues croisés avec quelques exemples de miARN (Chapitre 3.2.3).

d) La protéine TIA-1/TIAR

Les protéines TIA-1 (T cell restricted intracellular antigen-1) et TIAR (TIA-1 related protein) sont des protéines essentielles à la formation des granules de stress (Kedersha *et al.* 1999). Ces protéines d'une taille de 375 acides aminés, exprimées dans le cerveau, le testicule et la rate (Beck *et al.* 1996), présentent 3 domaines RRM dans la partie N-terminale et un domaine riche en glutamine dans la partie C-terminale. Le domaine RRM2 permet la reconnaissance et la fixation des ARN (Dember *et al.* 1996). Le domaine C-terminal, quant à lui, permet la association des protéines TIA entre elles et la formation des granules de stress (Gilks *et al.* 2004). Elles fixent des motifs ARE, riches en U ou en C présents dans les transcrits cibles (Kim *et al.* 2007). Elles ont une localisation nucléo-cytoplasmique et font la navette entre le noyau et le cytoplasme en réponse à un stress (Zhang *et al.* 2005).

Les protéines TIA-1/TIAR régulent également leurs transcrits cibles en inhibant dans certains cas la traduction. Les travaux de Piecyk *et al.* ont en effet mis en évidence la action répressive de TIA-1 sur le transcrite de TNF (Piecyk *et al.* 2000). Par ailleurs, ces dernières jouent un rôle prépondérant dans la formation des granules de stress en réponse à un stress cellulaire. La formation de ces structures arrête la traduction des transcrits tout en les protégeant de la dégradation. La formation des granules de stress, permet à la cellule d'utiliser son énergie afin de traduire uniquement les protéines essentielles à sa survie (protéines dégradées, lutte contre le stress oxydatif).

Il est intéressant de noter que en dehors de leur action sur la traduction de leurs ARN cibles, les protéines de liaison à l'ARN assurent aussi des fonctions sur le « processing » des ARN. En effet, il est maintenant avéré, qu'elles peuvent favoriser l'inclusion d'exons. On peut ainsi citer le travail d'Izquierdo, qui a pu démontrer le rôle de TIA-1 dans l'inclusion de l'exon 6 dans l'ARNm de Fas (Izquierdo *et al.* 2005), mais également que par son interaction avec la protéine U6 snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particles*), TIA-1/TIAR assure une fonction dans la reconnaissance et le choix du site de épissage en 5q (Izquierdo 2008). Leur capacité à interagir avec le facteur de épissage U1 snRNP (Förch *et al.* 2002) via les domaines RRM1 et C-terminal, en font d'importants régulateurs des mécanismes de épissage alternatif. Au total on voit que peu de RBP sont exprimées dans le rein, organe très hétérogène et que leurs fonctions, si elles existent sont loin d'être comprises.

3.2. Les microARN

Le dernier grand groupe de facteurs influençant la stabilité et la traduction des ARN et participant ainsi au contrôle post-transcriptionnel de l'expression de gènes est représenté par les microARN (miARN).

Au début des années 90, de petits ARN transcrits mais ne codant aucune protéine ont été identifiés chez *Caenorhabditis Elegans*. Ces nouveaux ARN se sont avérés cruciaux pour le développement de *C. Elegans*. Les travaux de Ambros, Lee et Feinbaum (Lee *et al.* 1993; Wightman *et al.* 1993) ont ainsi mis en évidence l'importance du miR-*lin-4* dans la régulation du gène *lin-14* et le contrôle de la division cellulaire au cours du développement larvaire. Ces travaux ont permis de montrer, pour la première fois, que l'expression génique pouvait être régulée par ces petits ARN. Dans les années 2000, le miARN *let-7* a également été identifié chez *C. Elegans* (Reinhart *et al.* 2000; Slack *et al.* 2000) et son rôle dans le passage du dernier stade larvaire à celui de l'adulte a été rapporté. Ce même miARN a, par la suite, été identifié chez l'Homme (Pasquinelli *et al.* 2000), ouvrant un nouveau domaine dans la régulation de l'expression génique et démontrant que l'ARN messager ne constitue pas uniquement une étape transitoire entre le gène et la protéine mais qu'il est soumis à d'importants mécanismes de régulation. Depuis, environ 2500 miARN ont été découverts chez l'Homme et sont référencés dans la miRBase 20.0 database (Kozomara & Griffiths-Jones 2011).

Les microARN sont définis comme étant de petits ARN non codants de 19 à 25 nucléotides, qui par leur action, permettent de contrôler négativement l'expression de transcrits cibles en bloquant leur traduction et/ou en accélérant leur dégradation.

3.2.1 Biogenèse des microARN

La voie canonique de biogenèse des miARN est décrite dans les paragraphes suivants, elle est également illustrée dans la figure 14. Les voies « dites non canoniques » ne seront pas abordées de manière détaillée dans ce manuscrit.

- Transcription des miARN

L'ARN Polymérase II (ARN Pol II) participe à la transcription des miARN et permet l'expression du pri-ARN, ce transcrit primaire correspond à une longue séquence ribonucléotidique arborant une structure de type tige-boucle. Les régions transcrites correspondant aux futurs miARN sont retrouvées au niveau des introns des transcrits codants et non codants majoritairement (Bartel 2004; Lee *et al.* 2004). Plus rarement, ces régions sont localisées dans des régions exoniques.

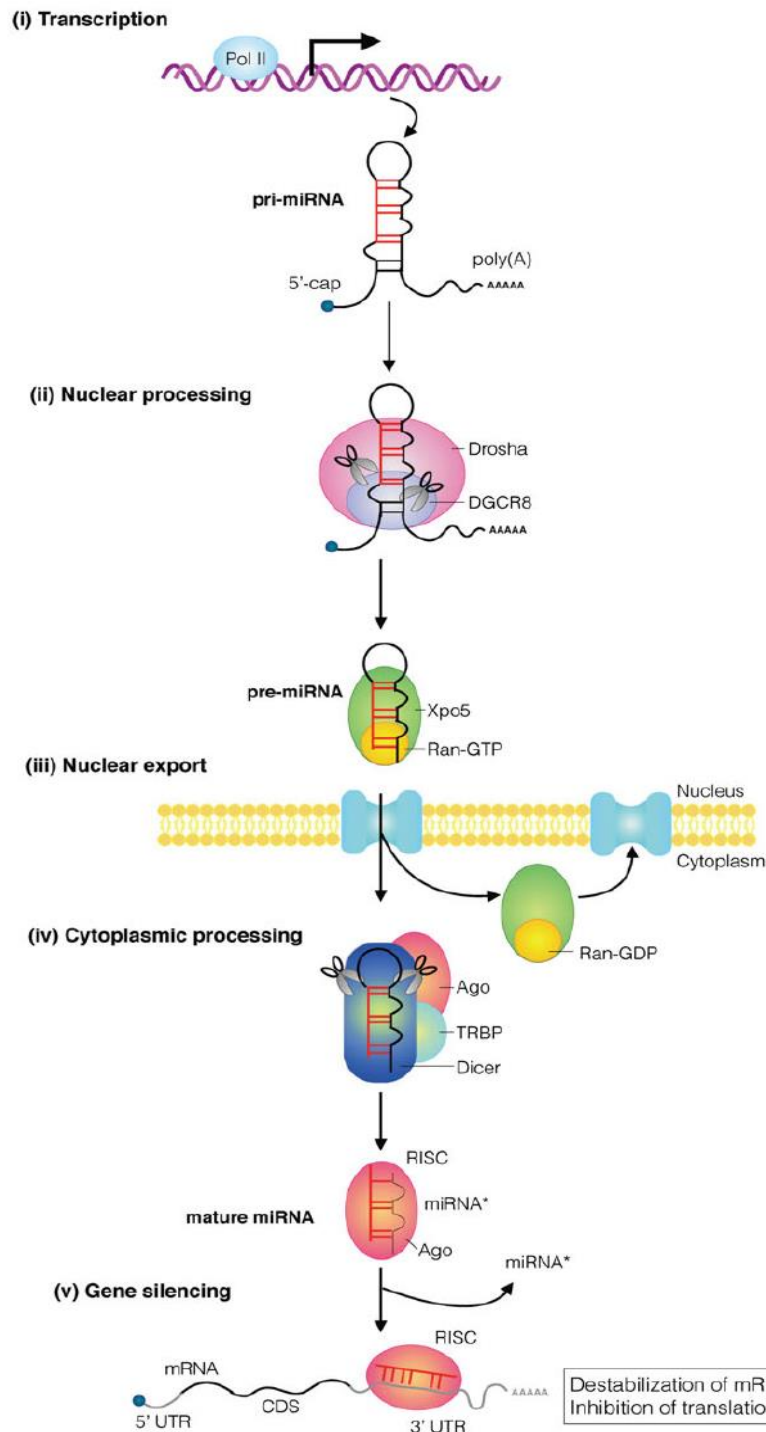


Figure 14 : Biogenèse des miARN.

(1) L'ARN Pol II initie la transcription du miARN primaire ou pri-miARN. Ce dernier subit une étape de maturation dans le noyau (2), le microprocesseur (Drosha et DGCR8) clive spécifiquement le pri-miARN pour générer un miARN précurseur ou pré-miARN. Ce pré-miARN est alors exporté vers le cytoplasme (3) via l'exportine 5 pour achever sa maturation. (4) Dicer, associé aux protéines TRBP et AGO, prend en charge le pré-miARN pour hydrolyser la boucle restante et ainsi former un duplex miARN-miARN. L'association de la protéine AGO au duplex miARN-miARN est suivie par la sélection du brin guide permettant la formation d'un complexe miRISC fonctionnel. (5) le complexe miRISC se hybride sur le transcrite cible grâce à la séquence guide et agit sur l'expression de sa cible en inhibant sa traduction ou en accélérant sa dégradation. (D'après Akiko Hata, 2015).

A l'heure actuelle, aucune région promotrice spécifique aux miARN n'a été identifiée, suggérant l'utilisation d'un promoteur commun avec le gène codant. Cette hypothèse n'est cependant pas exclusive en raison de la présence de multiples sites d'initiation de la transcription ou TSS (Lee *et al.* 2004). Il existe quelques cas particuliers où la transcription des miARN viraux et de quelques miARN endogènes dérivés des ARNt, est au contraire, assurée par l'ARN Pol III (Pfeffer *et al.* 2005; Babiarz *et al.* 2008). De plus, les miARN peuvent être régulés positivement ou négativement au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription tels que p53, MYC (Kim *et al.* 2009).

- Maturation du pri-miARN

Une fois le pri-miARN transcrit par l'ARN Pol II, ce dernier va subir plusieurs étapes de maturation afin d'aboutir à un miARN fonctionnel. Lors de cette première étape de maturation, la RNase III, Drosha, s'associe à la protéine DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) pour former un complexe nommé le microprocesseur. Ce dernier reconnaît les jonctions en 5' et en 3' du pri-miARN puis se fixe à ces jonctions *via* ses deux domaines dsRBD de liaison à l'ARN. Le positionnement du microprocesseur sur le pri-miARN au niveau de la jonction simple brin-double brin permet un clivage spécifique (11 pb après la jonction) des deux bras 3' et 5' du pri-miARN. En effet, en se positionnant sur son site catalytique, le microprocesseur réalise un clivage asymétrique du pri-miARN générant ainsi une nouvelle structure tige-boucle plus courte, le pré-miARN ou miARN précurseur, d'une taille de 60 à 70 nucléotides environ.

- Maturation du pré-miARN :

Ce pré-miARN est alors exporté vers le cytoplasme *via* les pores nucléaires grâce au complexe exportin 5 (EXP5)/RAN-GTP. Dans le compartiment cytoplasmique, le GTP est hydrolysé pour libérer le pré-miARN. Ce dernier est alors clivé par une deuxième RNase III, Dicer (Hutvagner *et al.* 2001) au niveau de la boucle restante, formant ainsi un duplex miARN-miARN d'une vingtaine de bases.

- Assemblage du complexe miRNA induced silencing complex (miRISC) :

Dicer fonctionne avec des partenaires lors des étapes d'assemblage du complexe miRISC : Argonaute 2 (AGO2), TRBP et/ou PACT. La protéine AGO2 fixe le duplex miARN-miARN afin de séparer ces deux brins. Il s'en suit une sélection du brin guide, ce brin guide correspond aux brins ayant l'extrémité 5' la moins stable favorisant ainsi l'association avec les transcrits cibles. AGO2, place alors son extrémité 5' entre les deux brins, c'est avec son domaine PAZ que la protéine Argonaute peut séparer les deux brins. Le brin non sélectionné ou passager est libéré dans le cytoplasme où il sera ensuite dégradé par des exonucléases.

A noter que des voies non canoniques pour la biogenèse des miARNs existent, ces dernières ne nécessitant pas l'action des RNases III Drosha et Dicer (Eulalio *et al.* 2008; Stroynowska-Czerwinska *et al.* 2014).

3.2.2 Mode d'action des miRNA

Les miARN régulent de façon négative l'expression de certains gènes en se hybridant sur des sites spécifiques sur leurs ARN cibles. Ces sites spécifiques de liaison aux miARN sont majoritairement retrouvés dans les régions 3'UTR (Bartel 2009), plus rarement au niveau des régions codantes (CDS) (Forman *et al.* 2008) ou les régions 5'UTR (Ørom *et al.* 2008). Cependant, les sites de fixation localisés dans les régions 5'UTR et CDS peuvent être moins fonctionnels que ceux retrouvés au niveau des régions 3'UTR. Ces sites de liaison sont caractérisés par la présence d'une séquence noyau ou « seed », située entre les nucléotides 2 et 7 à l'extrémité 5' du miARN guide. La liaison du complexe miRISC et du transcrite cible au niveau de cette séquence est essentielle à l'action répressive du miARN. Le reste de la séquence du brin guide (extrémité 3') forme des régions d'appariement additionnelles appelées sites 3' compensatoires. De plus, des mésappariements sont également observés au niveau de la région centrale des miARN entre les nucléotides 9 à 12, l'hybridation de cette région au transcrite cible étant rarement à l'origine du clivage de l'ARNm. En effet, la protéine AGO2 du complexe miRISC ne peut pas couper le transcrite cible malgré son activité endonucléasique.

Le devenir du transcrite dépend essentiellement de la nature de la fixation. En effet, une fixation imparfaite au niveau de ces sites provoque une inhibition de la traduction (He & Hannon 2004). Plusieurs hypothèses ont été émises concernant l'inhibition de la traduction par les miARN, elles sont représentées à la figure 15. Cette inhibition interviendrait lors de l'initiation de la traduction ou après celle-ci. Plusieurs causes ont été avancées, telles qu'un défaut de recrutement des ribosomes, la non-reconnaissance de la coiffe par les facteurs d'initiation, ou bien encore la répression de la sous-unité 60S (Stroynowska-Czerwinska *et al.* 2014). Au contraire, une hybridation parfaite accélère la dégradation des transcrits par l'intermédiaire de la fixation du complexe Dicer/RISC, ceci est illustré à la Figure 16 (Bartel 2004; Hartmann *et al.* 2004), étape qui est suivie par une désadénylation rapide (Wu & Belasco 2008) ou encore par le décapage de la coiffe en 5' (Eulalio *et al.* 2008) et par l'action d'exonucléases, telles que XRN1 ou des 3'5' exonucléases cytoplasmiques (Houseley & Tollervey 2009).

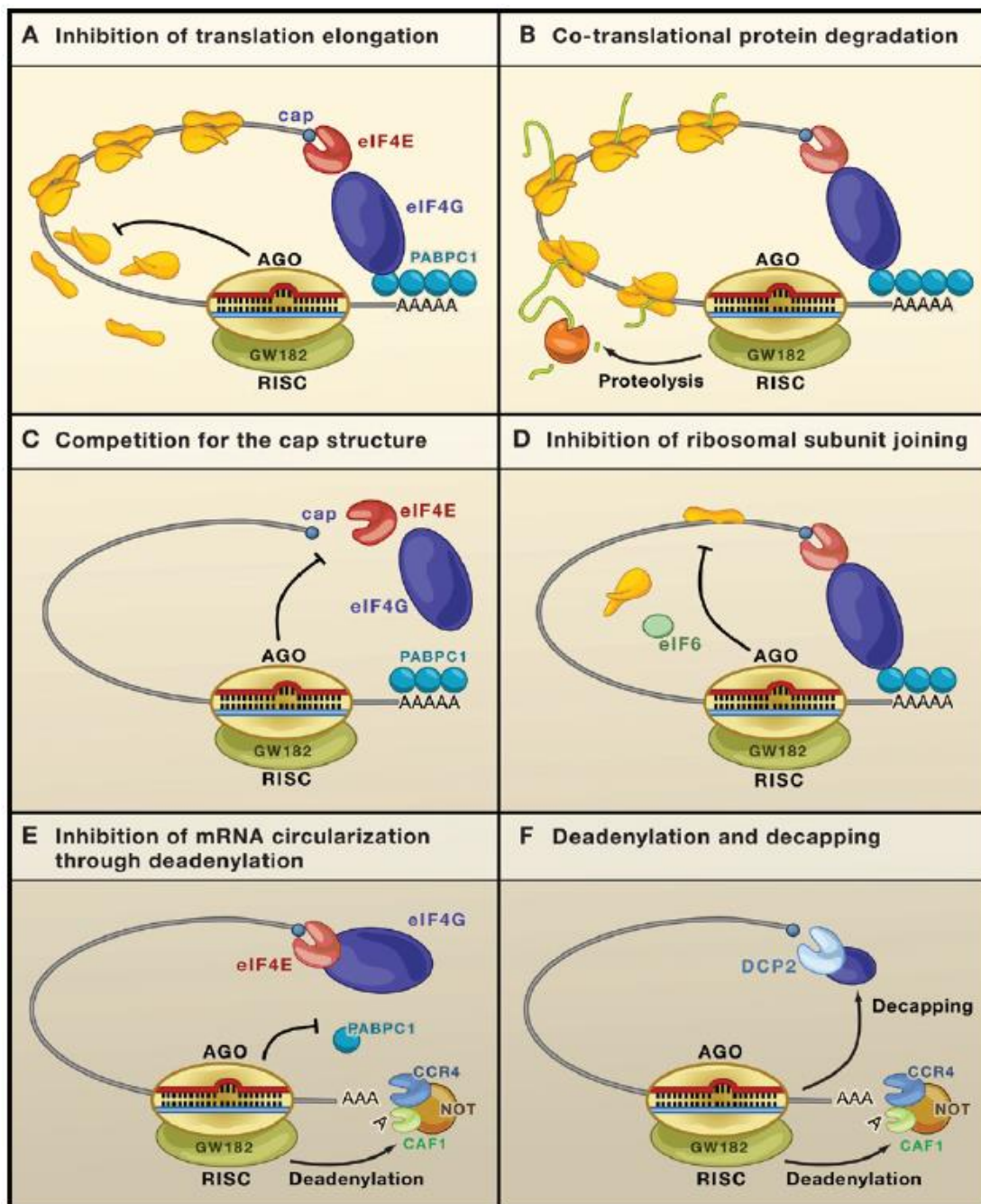


Figure 15: Mécanismes d'inhibition de la traduction par le complexe miRISC.

(A) La fixation du complexe miRISC empêche la progression du facteur d'initiation de la traduction eIF4G et provoque le détachement des sous-unités ribosomales. (B) Le polypeptide néo-synthétisé est simultanément dégradé. (C) La protéine argonaute (AGO2) du complexe miRISC entre en compétition avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G pour la fixation sur la coiffe en 5q. La fixation de l'AGO2 empêche l'initiation de la traduction. (D) La protéine AGO2 du complexe miRISC recrute le facteur eIF6 prévenant ainsi la fixation de la sous-unité ribosomale 60S à la petite sous-unité 40S. (E) La fixation de l'AGO empêche la circularisation du transcrite et augmente sa déadénylation. (F) Mécanisme de dégradation initié par le complexe miRISC qui va recruter la machinerie de dégradation des ARN après sa fixation sur le transcrite, ce mécanisme est plus explicitement décrit dans la figure 16. (D'après Eulalio *et al*, 2008).

Plus récemment, de nouveaux modes d'action des petits ARN ont été rapportés notamment dans le compartiment nucléaire où certains fragments de ARN double brin (miARN avant leur maturation) modulent le épissage alternatif (Liu *et al.* 2012). Les miARN sont également capables, dans des conditions particulières, de stimuler la traduction. En effet, les travaux de Vasudevan *et al.*, ont démontré que lors de l'arrêt du cycle cellulaire, le miR-369-3 permet, par sa fixation sur le transcrite TNF d'initier le recrutement des protéines AGO2 et FXR1 (Fragile X mental Retardation-related protein 1) et la traduction du transcrite TNF (Vasudevan *et al.* 2007; Mortensen *et al.* 2011).

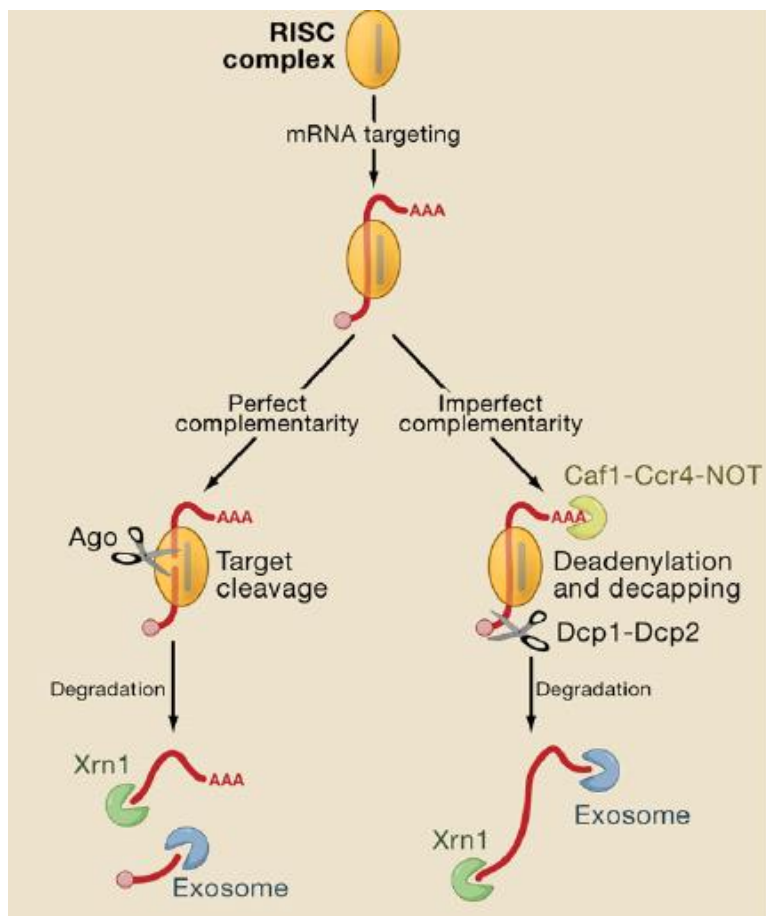


Figure 16 : Mécanismes de dégradation des ARNm initiée par l'action des miARN et du complexe RISC.

Dès que le complexe miRISC est fixé à son transcrite cible, c'est la qualité de l'hybridation qui détermine le devenir du transcrite. Une hybridation parfaite conduit au clivage de la cible par AGO suivie de sa dégradation par des exonucléases cytoplasmiques (3' à 5' ou Xrn1 (5' à 3')). En cas d'hybridation imparfaite, les désadénylases (Caf1-Ccr4 et NOT) hydrolysent la queue poly A alors que les protéines Dcp1 et Dcp2 font disparaître la coiffe en 5' laissant le transcrite sans protection face à l'action des exonucléases. (D'après Houseley & Tollervey 2009).

La régulation négative de l'expression de gènes cibles par les miARN conduit à d'importants changements durant le développement, en influant notamment la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la différenciation (He & Hannon 2004). Ceci est notamment possible grâce à la régulation par les miARN de nombreuses voies de signalisation telles que la voie JAK-STAT, NF- κ B ou encore la voie TGF β , en agissant directement sur l'expression des différents effecteurs de ces voies. On peut citer l'exemple de la voie JAK/STAT, qui est régulée négativement par la protéine SOCS1, cette dernière étant faiblement exprimée en condition normale. Néanmoins, son expression est induite après une stimulation par les cytokines, assurant ainsi un rétrocontrôle négatif sur la voie JAK/STAT (en bloquant notamment le recrutement de STAT). Le miR-155 a été décrit comme un régulateur négatif de SOCS1 dans les cellules T régulatrices (Lui *et al.* 2015). D'autres exemples relatent l'action du miR-18a sur PIAS3, un régulateur négatif de STAT3, un acteur de la voie JAK/STAT, dans l'adénocarcinome gastrique. Certains miARN, comme les miR-25 et miR-181c, jouent un rôle de suppresseur de tumeur grâce à leur effet négatif sur l'expression de Smad7, un effecteur de la voie TGF β . Ainsi, ces miARN vont inhiber la croissance tumorale et la migration cellulaire des cellules cancéreuses (Lui *et al.* 2015).

3.2.3. Dialogues croisés entre RBP/miARN

Il est, de plus en plus évident, que les acteurs de la régulation post-transcriptionnelle (miARN et RBP) par leurs actions sur un transcrite peuvent agir en synergie ou de manière opposée pour le contrôle de l'expression des transcrits cibles et de leur stabilité. Ceci est illustré dans la figure 17. Cette constatation découle de nombreux exemples démontrant l'influence de la fixation de l'un des acteurs post-transcriptionnels sur l'action stabilisatrice ou déstabilisatrice de l'autre lorsque les sites de liaison sont identiques ou à proximité. Ainsi, le travail de Cherradi *et al.*, sur l'expression du transcrite VEGF dans les cellules de la corticosurrénale en réponse à une stimulation par l'ACTH, a mis en évidence une boucle de régulation complexe de l'expression de VEGF assurée par Tis11b et HuR. En effet, la stimulation par l'ACTH, provoque la relocalisation de HuR vers le cytoplasme où il agit sur le transcrite de VEGF afin d'augmenter sa stabilité et son expression. Dans un second temps, l'ACTH stimule l'expression de Tis11b qui déstabilise le transcrite VEGF en réduisant son expression et son action dans la cellule corticosurrénaliennne. Il existe également une compétition pour la fixation sur la région 3'UTR de VEGF, lorsqu'elles sont exprimées au même instant (Cherradi *et al.* 2006). Ceci n'est qu'un exemple parmi tant d'autres de la compétition existant entre les RBP.

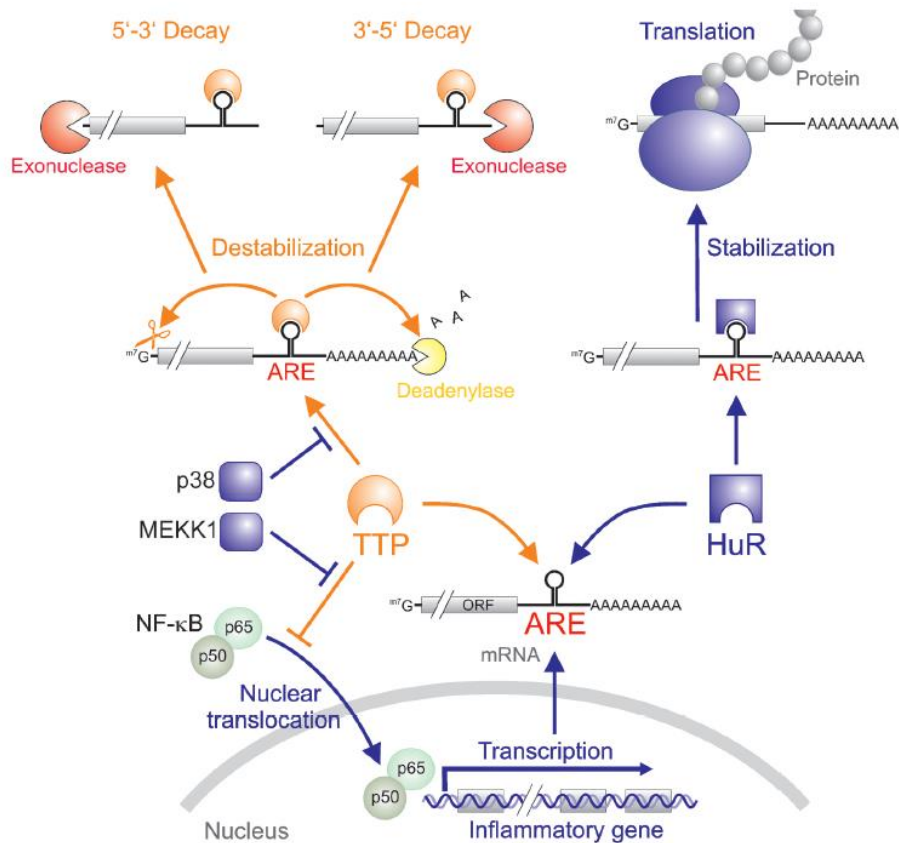


Figure 17 : Schéma illustrant la compétition entre TTP et HuR pour la régulation de la stabilité d'un même ARNm.

Lors d'une réaction inflammatoire, le facteur NF- κ B initie la transcription de gènes cibles. Une fois le transcrite synthétisé, polyadénylé et coiffé en 5' ce dernier est exporté vers le cytoplasme afin d'être traduit. La protéine HuR en se fixant au niveau des ARE présents dans la région 3'UTR stabilise le transcrite et permet le recrutement des ribosomes et de la machinerie transcriptionnelle. Au contraire, la protéine TTP accélère la dégradation du transcrite une fois liée au motif ARE. TTP permet le recrutement de déadénylases et d'exonucléases. La voie de dégradation des ARNm initiée par TTP peut-être inhibée par l'action de la kinase (p38, MEK1), qui en phosphorylant TTP prévient sa fixation sur ses transcrits cibles. (D'après Beiter *et al*, 2015).

Il est également intéressant de noter que les RBP peuvent agir sur l'expression d'autres RBP. Ainsi, Pullman *et al*, ont pu démontrer par immunoprécipitation, la capacité des RBP à lier les transcrits correspondant à d'autres RBP (Pullmann *et al*. 2007). De plus, les RBP sont capables d'agir conjointement avec les miARN pour accélérer la dégradation d'un transcrite ou au contraire de manière antagoniste. De nombreux exemples vont dans ce sens, comme c'est le cas dans le cancer de la vessie, où la RBP Pumilo fixe le transcrite E2F3, un inhibiteur de la tumorigenèse afin d'exposer les sites putatifs aux miARN miR-502 et miR-125b. La dégradation du transcrite E2F3, initiée par les miARN, permet la mise en place de la tumorigenèse. A l'opposé, un effet antagoniste a été mis en évidence entre HuR et le miR-16 pour le contrôle de l'expression de l'enzyme pro-inflammatoire Cox-2. La surexpression de HuR prévient la régulation négative par le miR-16 sur le transcrite dans le cas du cancer

colorectal. On peut supposer, dans ce cas, que la fixation de HuR prévienne celle du miARN (Ciafrè & Galardi 2013). Plus récemment, un rôle inhibiteur de AUF1 sur la synthèse de miARN a pu être démontré par Abdelmohsen *et al.* Ces auteurs ont montré que la surexpression de AUF1 réduit l'expression du transcrite et de la protéine Dicer (Abdelmohsen *et al.* 2012). Cette dernière donnée souligne la complexité des interactions entre les différents acteurs de la régulation post-transcriptionnelle pour le contrôle de l'expression d'un transcrite.

Nous venons de voir les acteurs principaux de ces mécanismes de régulation de l'expression, que sont les RBP et les miARN, qui par leur capacité à lier un transcrite, influent son devenir en accélérant sa dégradation, en inhibant sa traduction ou bien encore en le stabilisant afin d'augmenter son expression. Nous allons maintenant nous intéresser à un autre niveau de la régulation post-transcriptionnelle représenté par l'épissage alternatif.

3.3 Contrôle de l'expression des transcrits par épissage alternatif

L'épissage alternatif représente un mécanisme clé complexe de maturation spécifique des ARN messagers, présent aussi bien chez les plantes, les champignons que dans les cellules eucaryotes de mammifères. Ainsi, environ 25% des gènes de *C.elegans* (Ramani *et al.* 2011), 60% chez *Drosophila melanogaster* (Graveley *et al.* 2011), 42% chez *Arabidopsis thaliana* (Filichkin *et al.* 2010) et 95% des gènes humains (Pan *et al.* 2008) sont potentiellement soumis à un épissage alternatif. Ce mécanisme aboutit, à partir d'un même pré-ARN messenger, à plusieurs isoformes d'ARNm en fonction de leur composition exonique, conduisant potentiellement à modifier leur localisation, leur stabilité ou leur transport mais surtout d'augmenter la variabilité protéique des produits du gène.

3.3.1 Principes généraux sur l'épissage

L'épissage correspond à l'élimination précise des régions introniques non codantes d'un pré-ARN messenger et à la jonction des régions exoniques entre elles afin de former un ARN messenger mature prêt à être traduit. L'épissage est réalisé par un complexe multiprotéique, dénommé le spliceosome. Ce dernier est composé de cinq snRNP ou small nuclear ribonucleoprotein particules (U1, U2, U4/U6 et U5), qui contiennent chacune un petit ARN nucléaire et plusieurs protéines (plus de 200). L'épissage se fait, en général, de façon simultanée à la transcription des gènes. Il a même été démontré que la vitesse de la machinerie transcriptionnelle pouvait influencer sur les mécanismes d'épissages.

Au niveau de chaque exon, des séquences cis-régulatrices constitutives sont retrouvées : elles correspondent à des sites de épissage, ces derniers permettant la définition précise des limites de chaque exon et intron par le spliceosome. On distingue ainsi, les séquences localisées en aval de l'exon ou sites 5q épissage dits « donneurs » ou 5q Splice Site (5qSS) et les séquences en amont, dénommées les sites 3q épissage ou 3q Splice Site ou sites « accepteurs » (3qSS). Ces séquences sont représentées à la figure 18. Le 5qSS possède une séquence consensus présentant le di-nucléotide GU (ou GT dans la Figure 18), qui est reconnu par le snRNP U1 du spliceosome (McManus & Graveley 2011). Le site de épissage en 3q présente, quant à lui, une séquence consensus comportant le di-nucléotide AG et une séquence polypyrimidine « tract » qui est reconnue par le U2 snRNP, qui se lie au pré-ARNm au niveau du point de branchement A. La fixation de U1 et de U2 sur le pré-ARNm repose sur le principe de appariement des bases et permet la formation du pré-spliceosome (complexe A, Figure 19).

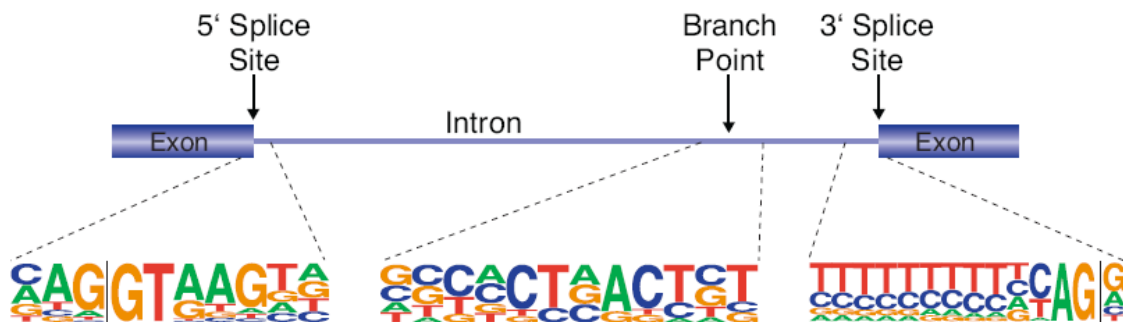


Figure 18 : Éléments régulateurs constitutifs de l'épissage.

Représentation schématique d'un pré-ARNm et des séquences constitutives pour l'épissage des introns : les sites de épissage 5q et 3q le point de branchement A, leurs séquences consensus sont également indiquées. (D'après McManus & Graveley, 2011).

La liaison coordonnée de plusieurs protéines au pré-spliceosome est nécessaire à son fonctionnement. Les hélicases ATPase-dépendantes de type DExD/H-box (Sub2/UAP56, Prp2, Prp5, Prp16, Prp22, Prp28 et Brr2), la GTPase Snu114 et les snRNP U4/U6 et U5 réorganisent complètement le spliceosome (Figure 19). La formation du site catalytique du spliceosome n'est possible qu'une fois que U2 et U6 se sont associées, le snRNP U6 se lie au niveau du site de épissage 5q à la place de U1 (complexe B). Le spliceosome alors activé (complexe Bq) est alors capable de réaliser deux réactions successives de trans-estérification, son site catalytique étant actif (complexe C). Ces deux réactions conduisent à l'exclusion de l'intron et à la ligation entre deux exons consécutifs (Wahl *et al.* 2009; Papasaikas & Valcárcel 2016).

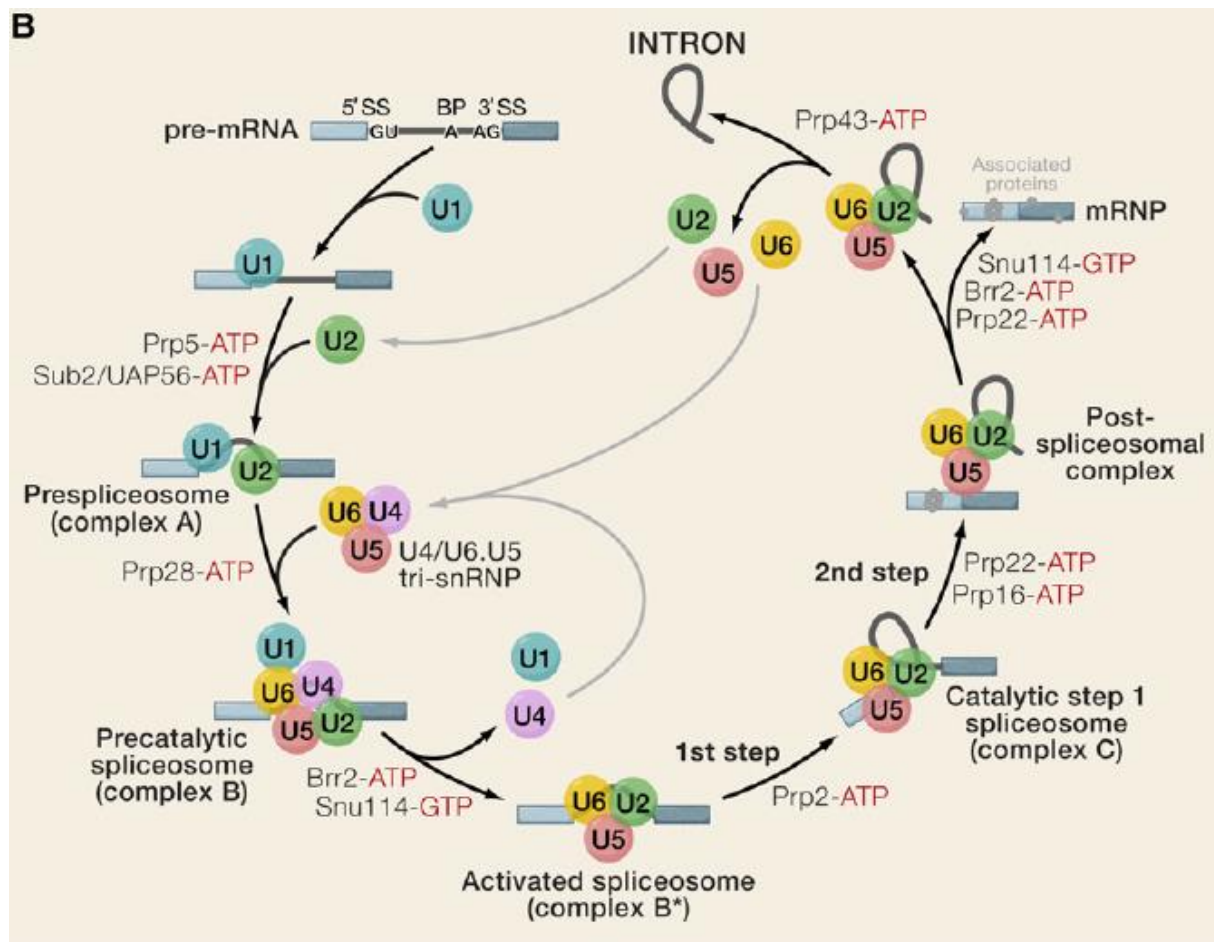


Figure 19 : Mécanisme d'action du spliceosome lors de l'épissage des introns.

L'assemblage du spliceosome suit une dynamique précise aboutissant à l'élimination de l'intron du pré-ARNm. Après reconnaissance des sites d'épissage en 5' et en 3' respectivement par le snRNP U1 et U2, leur fixation permet la formation du pré-spliceosome. Ce dernier activé par la fixation à un moment précis de différentes hélicases/ATPases RNA-dépendantes de types DExD/H (Sub2/UAP56, Prp2, Prp5, Prp16, Prp22, Prp28 et Brr2), de la GTPase Snu114 et des snRNP U4/U6.U5. Après activation, le spliceosome réalise deux étapes catalytiques (trans-estérification), qui conduisent à l'exclusion de l'intron et la jonction des exons consécutifs. (Wahl *et al.* 2009).

3.3.2 Eléments régulateurs de l'épissage alternatif

L'épissage alternatif se caractérise, quant à lui, par l'inclusion ou l'exclusion différentielle des exons mais aussi des introns dans certains cas, afin d'aboutir à un nouveau transcrit mature. Ce dernier met en jeu une compétition entre les sites d'épissage en 5' et 3' (5'SS et 3'SS) mais c'est la présence des séquences auxiliaires *cis*-actives, qui va jouer un rôle déterminant dans la régulation positive ou négative de l'épissage alternatif. Ces séquences sont identifiées en fonction de leur localisation sur le pré-ARNm. Ainsi, on peut les diviser en plusieurs sous-types : les séquences activatrices ou enhanceurs ESE pour Exonic Sequence Enhancer et ISE pour Intronic Sequence Enhancer et les séquences inhibitrices ou silenciers ESS pour Exonic Sequence Silencer et ISS pour Intronic Sequence Silencer (Figure 20).

La présence de ces séquences va permettre le recrutement et la fixation de RBP agissant en *trans* en tant que facteurs de épissage. Les plus connus appartiennent à la famille des protéines SR (Sérine/Arginine), qui sont généralement considérées comme des activateurs de épissage alternatif et la famille des protéines hnRNP qui, au contraire, répriment épissage d'un pré-ARNm après leur fixation. Il est important de noter que en fonction de la localisation de ces séquences et de l'environnement cellulaire, ces séquences vont pouvoir moduler l'effet répressif ou activateur des facteurs de épissage (McManus & Graveley 2011). On peut citer l'exemple de la hnRNP L, qui inhibe épissage par sa liaison aux motifs riches en CA, lorsqu'ils sont localisés dans les exons (Rothrock *et al.* 2005). Mais à l'inverse, cette protéine favorise épissage lorsque ces motifs sont introniques (Hui *et al.* 2003). De nombreux autres exemples existent notamment celui de la protéine NOVA, un facteur de épissage très connu, dont la position sur le pré-ARNm est déterminante pour son action sur épissage alternatif des transcrits. L'analyse par séquençage haut débit après greffage covalent ou crosslink et immuno-précipitation des ARN ou HITS-CLIP de ces sites de fixation a révélé que NOVA est capable d'induire ou d'inhiber épissage en fonction de la localisation des séquences régulatrices sur le transcrit. Ainsi, lorsque la région cis-active est en aval de l'exon alternatif, il y aura activation de l'inclusion d'exon. Au contraire, sa présence en amont d'un exon alternatif va inhiber l'inclusion (Licatalosi *et al.* 2008).

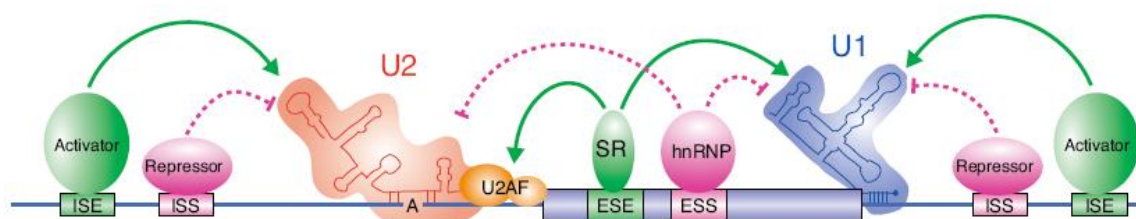


Figure 20 : Mécanismes de base de l'épissage alternatif.

Représentation schématique des séquences cis-activatrices nécessaires aux mécanismes de épissage alternatif. Les facteurs agissant en *trans* et capables de fixer ces éléments sont également représentés.

ESE : exonic sequence enhancers ; ESS : exonic sequence silencers ; ISE : intronic sequence enhancers ISS : intronic sequence silencers. (D'après McManus & Graveley, 2011).

Les protéines SR, fixées aux séquences de type ISE ou ESE recrutent, grâce à des interactions protéines/protéines, les snRNP U1 et U2AF lors de l'assemblage du spliceosome, facilitant ainsi épissage des transcrits (Figure 20). Au contraire, les protéines hnRNP A/B agissent comme des facteurs négatifs, potentiellement grâce à la formation d'oligomères le long du transcrit, prévenant ainsi la fixation du spliceosome. Une autre hnRNP-I ou PTB (Polypyrimidine-tract-Binding Protein) va, quant à elle, interférer avec U2, qui n'est plus capable de reconnaître les sites 3'SS, empêchant l'assemblage du pré-spliceosome (Fu & Ares 2014). De plus, la phosphorylation et la déphosphorylation des

facteurs de splicing modulent également leur activité et, par extension, les événements de splicing alternatif.

La coopération des différents facteurs de splicing complexifie encore un peu plus la compréhension des mécanismes sous-jacents régulant l'expression génique. De nombreux exemples relatent, en effet, l'action conjointe de NOVA et RBFOX ou encore celle de PTB et de QKI pour la régulation d'un même gène (Fu & Ares 2014).

D'autres facteurs sont également connus pour moduler les processus de splicing alternatif, comme, par exemple, les structures secondaires et tertiaires des ARN. Ces dernières vont ainsi modifier l'accessibilité et la fonction des éléments régulateurs et des protéines impliquées dans le splicing (McManus & Graveley 2011). De plus, la structure secondaire de l'ARN est capable d'influencer le recrutement des facteurs de splicing. Ainsi, le groupe de Baraille *et al.*, a démontré que les séquences ESE et ESS, localisées au niveau de l'exon EDA du gène de la fibronectine, peuvent, en fonction de la structure secondaire, recruter différemment les protéines SR (Muro *et al.* 1999; Buratti *et al.* 2004).

3.3.3 Mécanismes de splicing alternatif

A ce jour, cinq modes principaux de splicing alternatif sont relativement bien décrits et représentés dans la figure 21. Ainsi, on peut mentionner le splicing alternatif de type « cassette exon » ou saut d'exon (Figure 21A), au cours duquel un exon est soit exclu soit retenu au sein du transcrit mature. Il s'agit du mode le plus fréquent de splicing alternatif. Nous avons ensuite, le splicing alternatif de type « rétention d'intron » (Figure 21B), dans lequel une séquence non codante n'est plus excisée et reste présente dans l'ARNm. Ce mécanisme est très rarement observé chez les mammifères. L'utilisation de sites de splicing alternatif en 5' et 3' (5'SS et 3'SS, Figure 21C et D) par le spliceosome permet également de générer de nouveaux transcrits. Enfin, le dernier mode correspond à l'exclusion mutuelle d'exon, un choix est fait entre deux exons de taille similaire lors de splicing alternatif, l'un ou l'autre exon est alors retenu dans le transcrit mature (Figure 21E). Ce mécanisme varie en fonction du type cellulaire ou dans certaines situations pathologiques ou de stress (Stevens & Oltean 2016).

A noter que l'utilisation de promoteurs alternatifs ou de signaux alternatifs de polyadénylation permettent également de générer des transcrits matures distincts. Ces mécanismes sont plus communément dénommés premier et dernier exon alternatif (*Alternative First Exon*, AFE et *Alternative Last Exon*, ALE) (Al-Ahmadi *et al.* 2009; Dutertre *et al.* 2014). Ces

mécanismes ne font pas véritablement partie des processus de épissage dans la mesure où leur régulation repose sur le choix des sites d'initiation et de terminaison de la transcription.

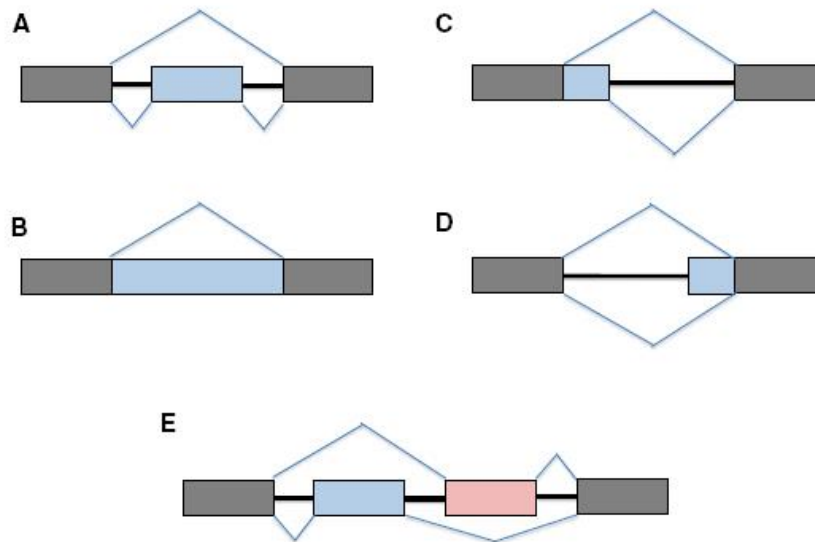


Figure 21 : Différents modes de épissage alternatif.

(A) « Cassette exon » ou saut d'exon. **(B)** Rétention d'intron. **(C)** Site de épissage alternatif en 5q **(D)** Site de épissage alternatif en 3q **(E)** Exclusion mutuelle d'exons. (D'après Stevens & Oltean 2016).

3.3.4 Mécanismes de dégradation des ARN associés à épissage alternatif

Il n'est pas rare que les isoformes de transcrits, générés lors de épissage alternatif, aboutissent à un décalage du cadre de lecture et à l'apparition d'un codon stop prématuré (Premature Terminal Codon ou PTC). Les transcrits sont soumis à un mécanisme de dégradation spécifique appelé NMD pour Non-sense Mediated mRNA Decay. Ce mécanisme de contrôle de la qualité des ARNm permet de sélectionner des transcrits correctement épissés afin qu'ils soient traduits dans la cellule. Ce contrôle permet ainsi d'éviter l'expression de protéines tronquées ou à l'origine de dysfonctionnement cellulaire et/ou de pathologies (mutations, défaut de transcription, défaut de épissage des pré-ARNm). En fonction de l'organisme, 5 à 30 % du génome est soumis à des mécanismes de NMD (Lykke-Andersen & Jensen 2015).

Le mécanisme de NMD est observé chez tous les eucaryotes, trois protéines extrêmement bien conservées sont essentielles au NMD : il s'agit des protéines UPF1, UPF2 et UPF3. Actuellement, plusieurs modèles de NMD sont proposés : le EJC model, le Faux 3qUTR model et le ribosome release model (Brognia *et al.* 2016). A noter que en fonction des modèles de NMD proposés, la présence d'un PTC n'est pas obligatoire pour initier cette voie de

contrôle des ARNm, notamment dans les modèles NMD faux-3'UTR et de relargage de ribosome.

- Le modèle EJC (End-Junction Complex)

Le codon stop est reconnu comme prématuré lorsqu'il est localisé à proximité d'un site d'épissage (~50-55 nucléotides). La détection du codon stop prématuré par le ribosome provoque l'arrêt de la traduction. La présence du complexe de jonction d'exon (EJC), toujours associé au transcrit, peut être identifié comme la marque d'un mauvais épissage. Les transcrits sont alors soumis au NMD. Les protéines SMG1 (une kinase UPF1) et UPF1 sont recrutées au niveau des ribosomes terminaux où elles sont associées avec les facteurs de relargage du néo-peptide (eRF1 et eRF3, Eukaryotic Release Factor) pour former le complexe SURF. L'interaction de ce complexe avec l'EJC est possible lorsque la traduction se termine à proximité d'un site d'épissage. La hélicase UPF1 est alors activée et l'ARNm dégradé.

- Le modèle faux-3'UTR

Ce modèle de NMD est initié par l'absence de fixation de la protéine PABPC (Cytoplasmic poly(A) binding protein) à la queue poly A et entraîne un retard dans l'avancement de la traduction (étape de terminaison et décrochage des sous-unités ribosomales). En l'absence de PABPC, UPF1 ainsi que les protéines de relargage (eRF1 et eRF3) sont recrutées permettant la dégradation rapide des ARN.

- Le modèle de relargage de ribosomes

Ce dernier modèle reposerait sur l'instabilité des ARN causée par l'apparition prématurée d'un codon stop, la séquence en aval, n'étant pas protégée par les ribosomes lors de l'étape de synthèse. La fixation d'UPF1 et des autres facteurs du NMD (eRF1, eRF3) conduit au décrochage des sous-unités ribosomales puis l'ARN est soumis à l'action de la machinerie de dégradation.

Nous venons de voir que les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle permettent un contrôle important de l'expression génique en agissant directement sur les transcrits et ce, à différentes étapes, notamment au niveau du «processing» des ARNm, en jouant sur l'édition de variants transcriptionnels via l'épissage alternatif, qui représente un mécanisme clé touchant environ 95 % des gènes chez l'homme. La régulation post-transcriptionnelle, grâce à l'action de ses effecteurs, les RBP et les miARN, influence le devenir du transcrit et

permet d'agir sur son expression en amont de sa traduction afin de répondre à différentes situations de stress cellulaire.

En conclusion, nous avons vu, dans la première partie de l'introduction, le rôle essentiel du rein dans le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique. Le second chapitre a rappelé les mécanismes précis et fins, qui permettent l'adaptabilité des cellules rénales aux variations des apports quotidiens ou aux conditions pathologiques. Nous avons également vu, qu'au centre de cette régulation fine de la réabsorption de sodium et de l'eau, l'aldostérone et son récepteur jouent un rôle prépondérant. En effet, ils initient la transcription de transporteurs ioniques au niveau des régions distales du néphron. L'altération de la voie de signalisation minéralocorticoïde accompagne notamment le développement de pathologies humaines. Ceci souligne l'importance de mieux comprendre les mécanismes régulant l'expression du MR. C'est, dans ce cadre, que les premiers travaux de l'équipe ont démontré l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR. Au cours de mon travail de thèse, j'ai donc cherché à identifier les acteurs de cette régulation et à comprendre quelles peuvent être les conséquences physiopathologiques.

OBJECTIFS

Le rôle physiologique du MR dans la réabsorption sodée et sa participation au contrôle de la pression artérielle est relativement bien connu. L'implication déterminante de ce facteur de transcription dans le développement ou la progression d'un certain nombre de maladies humaines est maintenant avérée. Cependant, les mécanismes sous-jacents à ces processus physiopathologiques restent à établir. De nombreuses données expérimentales ou études cliniques ont montré qu'une altération de la voie de signalisation minéralocorticoïde est associée à diverses pathologies telles que l'hypertension artérielle, la fibrose cardiaque, l'insuffisance cardiaque, les déshydratations associées à de graves pertes de sodium, le syndrome métabolique ou encore certaines pathologies rénales (Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez 2014; Jaisser & Farman 2016). Chez les patients, l'utilisation des antagonistes du MR a largement démontré leurs effets bénéfiques sur l'amélioration et la prévention de la fibrose rénale et cardiaque, confirmant le rôle prépondérant de la signalisation minéralocorticoïde dans l'étiopathogénie de ces maladies (Pitt *et al.* 1999, 2003; Lam *et al.* 2006). C'est pourquoi, il est aujourd'hui essentiel d'identifier les mécanismes moléculaires contrôlant l'expression rénale du MR pour mieux appréhender ces pathologies et proposer de nouvelles voies thérapeutiques aux patients.

Lorsque mon projet de thèse a démarré, plusieurs questions restaient ouvertes :

- **Quels sont les acteurs moléculaires modulant l'expression rénale du MR en réponse aux variations de tonicité extracellulaire ?**

Les travaux réalisés, il y a une vingtaine d'années et portant sur l'étude de l'expression du MR dans le rein, nous ont appris que le MR est fortement exprimé dans les segments distaux corticaux où la lumière tubulaire est hypotonique (50 mOsmol/kg). À l'inverse, l'expression du MR est comparativement plus faible dans la médullaire rénale, qui baigne dans un milieu hypertonique (1200 mOsmol/kg) (Doucet & Katz 1981; Lombès *et al.* 1990a). Ces variations extrêmes de la tonicité, générées par le gradient corticopapillaire, pourraient en partie expliquer l'expression différentielle du MR observée le long du néphron. Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'expression différentielle du MR, nous avons développé un modèle de cellules rénales hautement différenciée, exprimant le MR, ses gènes cibles spécifiques et capable de répondre spécifiquement aux variations extrêmes de tonicité (Viengchareun *et al.* 2009). À l'aide de ce modèle, notre laboratoire a pu démontrer que les variations de tonicité extracellulaire modulent l'expression du MR par l'intermédiaire d'un mécanisme post-transcriptionnel contrôlant l'expression des transcrits MR (Viengchareun *et al.* 2009).

L'analyse de la région 3'UTR du transcrite MR a permis de révéler la présence d'éléments de liaison à ces modulateurs post-transcriptionnels suggérant l'implication de protéines de liaison et/ou de miARN dans le contrôle de l'expression rénale du MR.

- **Quelles sont les conséquences de ce contrôle post-transcriptionnel sur l'expression rénale du MR et la signalisation minéralocorticoïde ?**

L'action physiologique de l'aldostérone est étroitement liée à l'expression du MR dans ses tissus cibles. En plus des mécanismes post-traductionnels (Tallec *et al.* 2003; Viengchareun *et al.* 2007; Faresse 2014) capables de réguler l'activité du MR, les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle, mis en évidence, peuvent réguler son expression (Viengchareun *et al.* 2009). Ainsi, en augmentant ou en diminuant l'expression du MR dans les tissus cibles de l'aldostérone, les protéines impliquées dans ces mécanismes post-transcriptionnels modulent directement la sensibilité rénale à l'action de l'hormone régulant ainsi positivement ou négativement les voies de signalisation minéralocorticoïde.

- **Quel est le retentissement physiopathologique de ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle ?**

En tant que principal effecteur de la stimulation hormonale de l'aldostérone, le MR joue un rôle primordial dans l'homéostasie hydro-électrolytique et le maintien de la pression artérielle. Les conséquences délétères de son inactivation ou sa suractivation sont maintenant établies et sont évoquées dans de nombreuses pathologies. Au laboratoire, nous avons par exemple démontré un lien entre la faible expression rénale du MR à la naissance et la résistance partielle associée à des pertes de sel chez le nouveau-né (Martinerie *et al.* 2009a, b). Ces résultats sont en accord avec les modèles animaux génétiquement invalidés pour le MR qui meurent quelques jours après la naissance consécutivement à une perte sodée majeure (Berger *et al.* 1998). Nous avons également démontré au laboratoire que l'inverse, la surexpression du MR chez la souris induit un phénotype pathologique cardiaque et rénal (cardiomyopathie, dilatation tubulaire) (Le Menuet *et al.* 2001).

Dans son ensemble, ce projet vise donc, d'une part à disséquer les mécanismes moléculaires post-transcriptionnels permettant de contrôler finement l'expression rénale du MR en réponse aux variations de tonicité extracellulaire, et d'autre part à évaluer les conséquences de cette régulation sur la signalisation minéralocorticoïde rénale dans un modèle cellulaire puis chez l'animal.

Dans cette optique, je préciserai dans un premier temps le rôle des RBP et des miARN potentiellement candidats. Nos résultats précédents avaient permis d'établir que l'exposition des cellules rénales à une hypertonicité extracellulaire (500 mOsmol/L) entraîne une forte diminution de l'expression du MR. A l'opposé, dans des conditions hypotoniques (150 mOsmol/L), une augmentation nette de l'expression du MR est observée ((Viengchareun *et al.* 2009).

Ainsi, dans la première partie de mon travail de thèse, j'ai concentré mes recherches sur une protéine déstabilisatrice d'ARN appelée Tis11b parce que des analyses *in silico* avaient permis d'établir qu'il existait des éléments de réponse à la tonicité dans le promoteur de son gène. J'ai donc cherché à établir définitivement le rôle de cette protéine dans le contrôle de l'expression du MR au niveau rénal.

Dans la seconde partie de ma thèse, je me suis intéressée à la protéine HuR, une autre RBP qui agit comme une protéine stabilisatrice des ARNm. J'ai démontré, dans ce travail, que HuR exerce un rôle direct dans l'augmentation de l'expression rénale du MR en réponse à une hypotonicité extracellulaire. Par ailleurs, nous avons démontré que HuR exerce des fonctions dans l'épissage alternatif en contribuant notamment à l'édition d'un nouveau variant du MR nommé MR⁶. J'ai également précisé l'impact de ces effecteurs (HuR et Tis11b) sur la signalisation minéralocorticoïde en analysant leurs conséquences sur la réponse hormonale induite grâce à un modèle de cellules rénales. Je discute également dans cette partie, la relevance physiopathologique de ces mécanismes et leur possible existence dans d'autres tissus cibles de l'aldostérone et du MR.

Dans la dernière partie de ma thèse, je présenterai les résultats préliminaires sur le rôle des miARN dans le contrôle de l'expression du MR. Grâce à une approche haut débit sur plaques TLDA, notre équipe avait identifié une centaine de miARN, dont l'expression semblait être modulée par les variations de tonicité extracellulaire. J'ai donc cherché à valider un certain nombre de ces miARN candidats.

L'ensemble de ce travail a permis de décrire finement les mécanismes de régulation de l'expression rénale du MR et apporte de nouvelles connaissances sur les processus adaptatifs rénaux. De plus, les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle décrits dans ce manuscrit pourraient être impliqués dans l'étiopathogénie de certaines maladies rénales, systémiques ou encore dans les syndromes de résistance minéralocorticoïde physiologiques ou pathologiques. *In fine*, l'ensemble de ce travail permettra d'avoir une meilleure compréhension du développement de certaines pathologies liées au MR et pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

RESULTATS

1^{ère} Partie :

Action déstabilisatrice de la protéine Tis11b sur le transcrit MR en réponse à une hypertonicité et conséquences sur la signalisation minéralocorticoïde

1. Justification du projet

1.1. Contexte de l'étude :

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, l'expression du MR représente l'élément clé de la réponse à l'aldostérone mais ce niveau d'expression peut être altéré dans certaines pathologies rénales, c'est pourquoi il est essentiel de comprendre les mécanismes de régulation, qui gouvernent son expression rénale.

Les travaux de Alain Doucet et de Marc Lombès avaient permis de montrer que l'expression du MR varie selon les segments néphroniques (Doucet & Katz 1981; Lombès *et al.* 1990b). Ces segments néphroniques sont, par ailleurs, soumis à des fluctuations extrêmes de la composition des fluides extracellulaires, dues en partie à la capacité du rein à diluer l'osmolalité de l'urine en dessous de celle du plasma ou de la concentrer au-dessus de celle du plasma (Fenton & Knepper 2007). C'est sur la base de ces travaux, que le laboratoire s'est appuyé pour proposer l'hypothèse selon laquelle les variations de tonicité extracellulaire pourraient moduler l'expression du MR le long des tubules.

1.2. Modèle d'étude :

Pour essayer d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse de travail, le laboratoire a développé, par une stratégie d'oncogenèse ciblée chez la souris, le modèle KC3AC1, qui correspond à un modèle de cellules rénales issues du CCD. La souris transgénique utilisée exprimait l'oncogène immortalisant « Antigène grand T du virus simien 40 » (SV40) sous le contrôle du promoteur proximal P1 du gène *NR3C2* codant le MR humain, permettant ainsi de cibler l'expression du transgène dans tous les tissus cibles du MR. Les cellules KC3AC1, isolées après microdissection des CCD, présentent à leur pôle apical des microvillosités et des desmosomes. Elles forment à confluence des dômes, ce qui suggère qu'elles sont le siège d'un transport transépithélial vectorisé (Viengchareun *et al.* 2009).

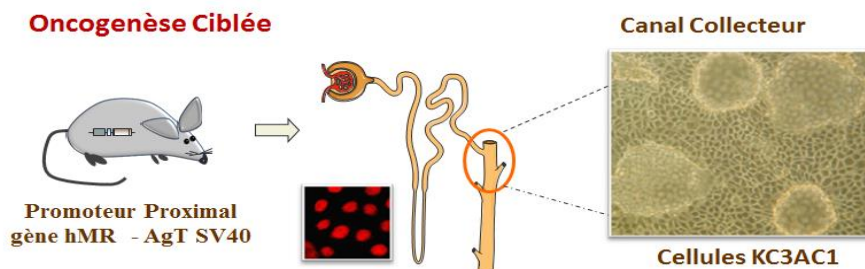


Figure 22 : Stratégie d'oncogenèse ciblée chez la souris.

Les cellules rénales KC3AC1 ont été isolées à partir des CCD d'une souris transgénique exprimant l'Antigène T de SV40 sous le contrôle du promoteur proximal du gène *NR3C2*. Les cellules forment à confluence un épithélium dense après une semaine de culture, et présentent de nombreux dômes cellulaires, visibles au microscope optique.

A l'origine des cellules rénales, qui sont soumises à des variations extrêmes de la tonicité extracellulaire générées par le gradient corticopapillaire, les cellules KC3AC1 sont capables de résister aux variations de tonicité, et notamment à l'hypertonie extracellulaire, grâce à l'expression du facteur de transcription TonEBP (*TonE Binding Protein* ou *NFAT5*). Lorsque les cellules rénales sont soumises à une augmentation de la tonicité, le facteur TonEBP est phosphorylé puis migre vers le noyau. Une fois dans le noyau, TonEBP se fixe au niveau du promoteur de ses gènes cibles sur des éléments de réponse à la tonicité (TonE), permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et la transcription de ses gènes cibles, tels que le gène de l'aldose réductase, des co-transporteurs sodium-myo-inositol, sodium-chlorure-bétaïne ou bien encore du transporteur de la taurine (Burg *et al.* 2007; Berl 2009). Nous avons montré dans les cellules KC3AC1, que l'induction de l'expression de TonEBP (transcrit et protéine) par l'hypertonie extracellulaire augmente considérablement l'expression du gène de l'aldose réductase (Viengchareun *et al.* 2009). Ainsi, les cellules KC3AC1 sont en mesure de lutter contre l'hypertonie extracellulaire en produisant des osmolytes intracellulaires, comme le sorbitol.

Ces cellules KC3AC1, hautement différenciées, expriment de façon endogène un MR fonctionnel et répondent à des doses physiologiques d'aldostérone (Figure 23). En effet, le MR migre vers le noyau en réponse à l'aldostérone, et stimule la transcription de ses gènes cibles tels que la sous-unité du canal *ENaC* ou encore *Sgk1*. Par ailleurs, l'aldostérone stimule la réabsorption de sodium du pôle apical vers le pôle basolatéral lorsque les cellules sont cultivées sur des filtres (Viengchareun *et al.* 2009). L'ensemble de ces résultats démontre que les cellules KC3AC1 représentent un bon modèle de cellules principales rénales pour l'étude des mécanismes régulant l'expression du MR.

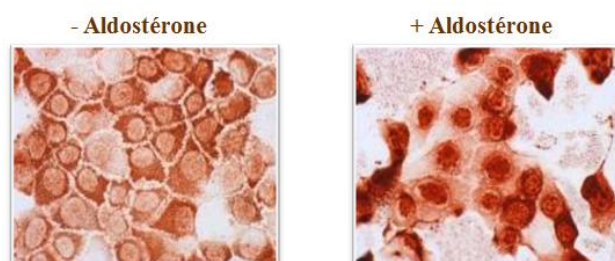


Figure 23 : Expression du MR endogène dans les cellules KC3AC1 et localisation nucléocytoplasmique en réponse à l'aldostérone.

Immunocytochimie du MR réalisée dans les cellules KC3AC1 avec l'anticorps spécifique 39N, en absence et en présence d'aldostérone. (D'après Viengchareun *et al.* 2009)

1.3. Hypothèses de travail :

Grâce à ce modèle cellulaire, l'équipe a démontré que les variations de tonicité extracellulaire modulent l'expression rénale du MR : l'hypertonie réprime, en particulier, l'expression du MR (x 1/2) alors que l'hypotonie augmente son expression (x 4) au niveau des transcrits et de la protéine. L'utilisation d'un inhibiteur de la traduction (cycloheximide) et d'un inhibiteur de la transcription (actinomycine D) ont permis de montrer que les effets de l'hypertonie et de l'hypotonie passent par des effets post-transcriptionnels (Figure 24) (Viengchareun *et al.* 2009).

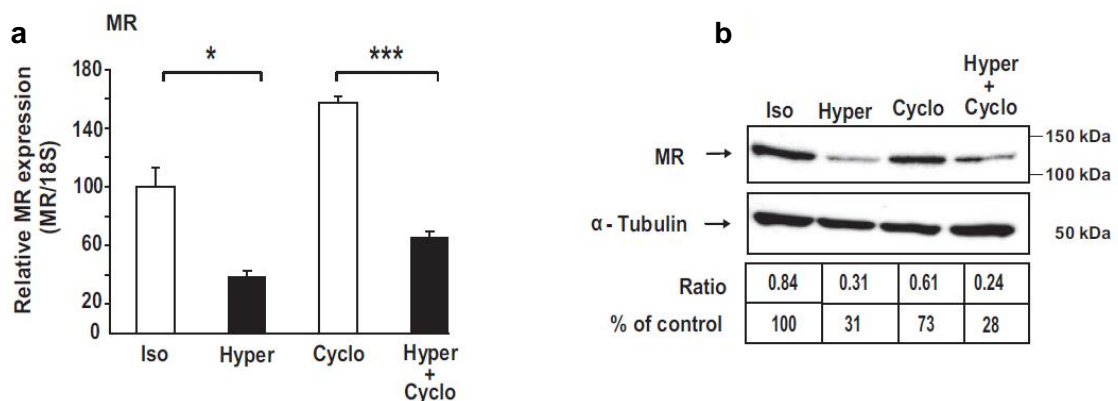


Figure 24 : Effet de l'hypertonie sur le transcrit et la protéine MR.

(a) Les cellules KC3AC1 ont été soumises pendant 6 h à la présence (Hyper) ou à l'absence (Iso) de 0,2 M Raffinose et/ou à l'action du cycloheximide. Après extraction des ARN, l'expression du MR est mesurée par RT-qPCR. (b) Les cellules KC3AC1 sont exposées pendant 18 h à des conditions isotoniques (Iso) ou hypertoniques (Hyper) et/ou à l'action du cycloheximide. Après réalisation d'un lysat protéique, l'expression de la protéine MR est quantifiée par Western Blot. (D'après Viengchareun *et al.* 2009).

L'analyse *in silico* de la région 3'UTR des gènes MR humain et murin a révélé la présence de motifs de liaison pour des protéines de liaison à l'ARN (appelés ARE), suggérant que le transcrit du MR pourrait être une cible de certaines protéines de liaison à l'ARN. Dans ce contexte, l'équipe s'est particulièrement intéressée à la protéine Tis11b, qui présente dans la région promotrice de son gène *ZFP36L1*, quatre éléments TonE. La découverte de ces éléments TonE suggérait une régulation possible de l'expression de Tis11b par le facteur TonEBP lors d'un stress hypertonique. Les résultats de l'équipe ont aussi permis de montrer que l'expression des transcrits et de la protéine Tis11b augmentent en condition hypertonique de façon parallèle avec celle de TonEBP (Figure 25) (Viengchareun *et al.* 2009). Ces résultats suggéraient aussi que la protéine Tis11b est une cible directe de TonEBP dans les cellules KC3AC1. L'ensemble de ces résultats nous a amené à formuler l'hypothèse que Tis11b pourrait être responsable de la réduction de l'expression du MR lors d'un stress hypertonique extracellulaire.

Ces résultats constituaient la première démonstration que l'expression rénale du MR est modulée par les variations de tonicité extracellulaire grâce notamment à la mise en place de mécanismes post-transcriptionnels. A la suite de ce travail, il restait à préciser les acteurs principaux de ce mécanisme de régulation.

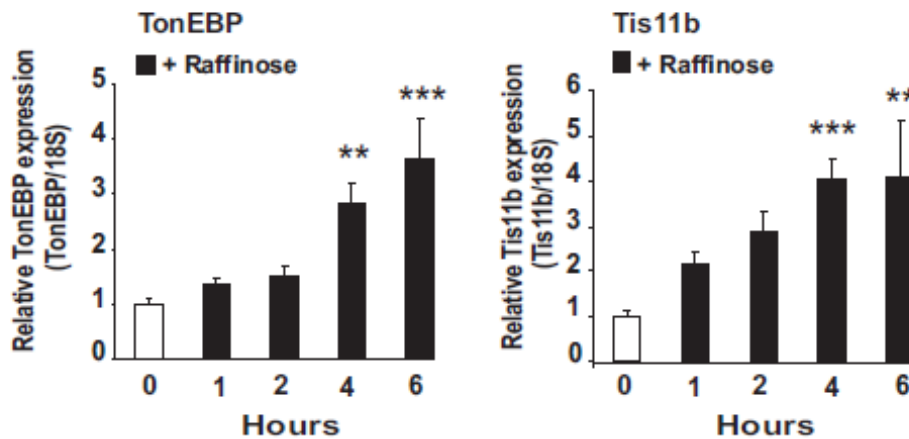


Figure 25 : L'hypertonie extracellulaire stimule l'expression de TonEBP et de Tis11b.

Les cellules KC3AC1 sont soumises à l'action du raffinose 0.2 M au cours d'une cinétique allant de 1 h à 6 h. Le point 0, correspond à une condition contrôle où les cellules sont maintenues dans des conditions isotoniques. Une extraction des ARN puis une quantification de l'expression de TonEBP et de Tis11b par RT-qPCR ont été ensuite réalisées. (D'après Viengchareun *et al*, 2009).

1.4. Objectifs du travail :

Dans cette première publication de Thèse, nous avons cherché :

- ✓ à démontrer l'implication de la protéine déstabilisatrice d'ARN Tis11b dans la régulation de l'expression du MR en réponse à l'hypertonie
- ✓ à identifier les motifs ARE essentiels à son action déstabilisatrice
- ✓ à analyser les conséquences fonctionnelles de la diminution de l'expression du MR sur l'expression de ses gènes cibles
- ✓ à analyser l'expression du MR et de Tis11b dans le rein de souris soumises à des conditions expérimentales altérant le gradient corticopapillaire

Les principaux résultats obtenus sont présentés dans l'Article 1.

Article 1

Hypertonicity compromises renal mineralocorticoid receptor signaling through Tis11b-mediated posttranscriptional control

Ingrid Lema^{*}, Say Viengchareun^{*}, Khadija Lamribet, Vixra Kéo, Anne Blanchard,
Nadia Cherradi, Marc Lombès

^{*} Ces auteurs ont contribué de façon équivalente.

J Am Soc of Nephrol, 2014 Oct;25(10):2213-21

Hypertonicity Compromises Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling through Tis11b-Mediated Post-Transcriptional Control

Say Viengchareun,^{*†} Ingrid Lema,^{*†} Khadija Lamribet,^{‡§||} Vixra Keo,^{*†} Anne Blanchard,[¶] Nadia Cherradi,^{‡§||} and Marc Lombès^{*†**}

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U693, Le Kremlin-Bicêtre, France; [†]University of Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, Unité Mixte de Recherche-S693, Le Kremlin-Bicêtre, France; [‡]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1036, Grenoble, France; [§]Commissariat à l'Energie Atomique, Institute of Life Sciences Research and Technologies, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France; ^{||}University of Grenoble Alpes, Unité Mixte de Recherche-S1036, Grenoble, France; [¶]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre d'Investigations Cliniques 9201, Paris, France; and ^{**}Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital de Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Le Kremlin-Bicêtre, France

ABSTRACT

The mineralocorticoid receptor (MR) mediates the Na⁺-retaining action of aldosterone. MR is highly expressed in the distal nephron, which is submitted to intense variations in extracellular fluid tonicity generated by the corticopapillary gradient. We previously showed that post-transcriptional events control renal MR abundance. Here, we report that hypertonicity increases expression of the mRNA-destabilizing protein Tis11b, a member of the tristetraprolin/ZFP36 family, and thereby, decreases MR expression in renal KC3AC1 cells. The 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of human and mouse MR mRNA, containing several highly conserved adenylate/uridylylate-rich elements (AREs), were cloned downstream of a reporter gene. Luciferase activities of full-length or truncated MR Luc-3'-UTR mutants decreased drastically when cotransfected with Tis11b plasmid, correlating with an approximately 50% shorter half-life of ARE-containing transcripts. Using site-directed mutagenesis and RNA immunoprecipitation, we identified a crucial ARE motif within the MR 3'-UTR, to which Tis11b must bind for destabilizing activity. Coimmunoprecipitation experiments suggested that endogenous Tis11b physically interacts with MR mRNA in KC3AC1 cells, and Tis11b knockdown prevented hypertonicity-elicited repression of MR. Moreover, hypertonicity blunted aldosterone-stimulated expression of glucocorticoid-induced leucine-zipper protein and the α -subunit of the epithelial Na⁺ channel, supporting impaired MR signaling. Challenging the renal osmotic gradient by submitting mice to water deprivation, diuretic administration, or high-Na⁺ diet increased renal Tis11b and decreased MR expression, particularly in the cortex, thus establishing a mechanistic pathway for osmotic regulation of MR expression *in vivo*. Altogether, we uncovered a mechanism by which renal MR expression is regulated through mRNA turnover, a post-transcriptional control that seems physiologically relevant.

J Am Soc Nephrol 25: 2213–2221, 2014. doi: 10.1681/ASN.2013091023

Received September 26, 2013. Accepted January 15, 2014.

S.V., I.L., N.C., and M.L. contributed equally to this work.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Nadia Cherradi, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1036—Biologie du Cancer

et de l'Infection, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France, or Dr. Marc Lombès, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U693, Faculté de Médecine Paris-Sud, 63 rue Gabriel Peri, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France. Email: nadia.cherradi@cea.fr or marc.lombes@u-psud.fr

Copyright © 2014 by the American Society of Nephrology

Na⁺ transport is tightly regulated by aldosterone, a steroid hormone exerting its effects through activation of the mineralocorticoid receptor (MR), a transcription factor (NR3C2) highly expressed in the distal nephron.¹ Renal MR stimulates transcription of genes encoding ionic transporters involved in the reabsorption of Na⁺, such as the epithelial Na⁺ channel (ENaC) and the Na⁺/K⁺-ATPase.^{2,3} Other target genes have been identified, including the serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1, the with no lysine 1 kinase, and the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ), which all participate to the control of Na⁺ reabsorption in tight epithelia.⁴ Accumulating evidence underscores the major role played by MR and aldosterone in the pathogenesis of several human disorders, such as hypertension, heart failure, CKD, or mineralocorticoid resistance. Thus, MR signaling constitutes a central regulatory pathway given that activation of the mineralocorticoid pathway leads to marked Na⁺ retention, hypervolemia, high BP, and its subsequent end organ damages. It has been shown that renal MR expression positively correlates with the degree of renal scarring, the elevation of inflammatory markers, and the amount of proteinuria in patients.⁵ Importantly, pathogenesis of salt-sensitive hypertension and kidney injury were recently associated with activation of MR by Ras-related C3 botulinum substrate 1 (Rac1), a Rho-family small GTP binding protein, which emerged as a novel modulator of MR activity.⁶ Conversely, a low renal MR expression at birth accounts for the physiologic partial aldosterone resistance of human newborns,⁷ reminiscent of the MR haploinsufficiency reported in autosomal dominant pseudohypoaldosteronism.⁸ Lowering MR renal expression by RNA interference strategy both prevents progression of hypertension and attenuates renal damage.⁹ Thus, modulation of renal MR expression greatly affects kidney function. However, the mechanisms controlling renal MR expression remain poorly understood. MR gene transcription is directed by two functional promoters,¹⁰ whereas posttranslational modifications profoundly affect MR function.^{11,12} Nevertheless, post-transcriptional changes in mRNA processing in response to stress might also modify MR abundance in target cells.

Indeed, renal tubular cells are submitted to intense variations of the extracellular fluid tonicity generated by the corticopapillary gradient, which is pivotal for the regulation of ion and water transport.¹³ Of interest, MR expression level is relatively low in the medulla, where cells are exposed to high osmolality levels (1200 mOsm/kg), whereas its expression is high in the renal cortex,¹⁴ where tubular lumen is rather hypotonic (50 mOsm/kg). Protective mechanisms against hypertonic stress in mammalian cells involve the tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP), a transcription factor belonging to the Rel family,¹⁵ with activity that is upregulated by both enhanced TonEBP transcription and increased TonEBP nuclear localization.¹⁶ We have previously shown that hypertonicity drastically reduced MR transcript and protein levels and concomitantly increased *zfp361* gene expression in renal KC3AC1 cells.¹⁷ *zfp361* encodes the

protein tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11b (Tis11b), a member of the Tristetraprolin (TTP) RNA binding protein family, which regulates short-lived mRNA stability through its binding to adenylate-uridylylate-rich elements (AREs) located in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of target transcripts.¹⁸ We hypothesized that Tis11b may play a determinant role in the control of MR mRNA decay under hypertonic conditions. Here, we describe the molecular mechanisms by which hypertonicity-induced Tis11b expression in the kidney affects MR expression level and subsequently, MR signaling in cellular and mouse models. Modulation of such post-transcriptional mechanisms seems particularly relevant for the control of Na⁺ handling and BP.

RESULTS

Tis11b Decreases MR 3'-UTR-Driven Luciferase Activity through ARE

Several AREs were identified in mouse and human MR 3'-UTRs. These seven to nine regulatory motifs consist of AUUUA pentamers or UUAUUUA(U/A)(U/A) nonamers, of which ARE3, -4, -5, and -6 and ARE8 and -9 are highly conserved among species (Figure 1A). Human (2791 bp) and mouse (2781 bp) MR 3'-UTRs were cloned downstream of the luciferase reporter gene (pMIR-Luc report plasmid) and cotransfected in human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells with pTarget-Tis11b-encoding plasmid. Tis11b expression resulted in a dose-dependent reduction of human and mouse 3'-UTR-driven luciferase activity but did not affect pMIR-Luc control activity, indicating that MR 3'-UTR is crucial for repression by Tis11b (Supplemental Figure 1). In addition, Tis11b accelerated Luc-3'-UTR mRNA degradation, because its half-life ($t_{1/2}$) decreased from 7.2 to 4 hours in the presence of Tis11b (Supplemental Figure 2). The Tis11b mutant (RR), which is unable to bind ARE, did not efficiently reduce luciferase activity compared with wild-type Tis11b, indicating that specific Tis11b interaction with ARE is required for Luc-3'-UTR mRNA repression (Supplemental Figure 3). To identify Tis11b binding sites within MR 3'-UTR, truncated mutants ($\Delta 1$ to $\Delta 4$) were generated. Human $\Delta 2$ (h $\Delta 2$) and h $\Delta 4$ mutants, which harbor proximal ARE3, -4, -5, and -6 and distal ARE8, -9, and -10, respectively, led to a significant decrease in luciferase activity in the presence of Tis11b (68% and 35%, respectively) compared with the 60% reduction of luciferase activity observed with the entire MR 3'-UTR (Figure 1B). Of interest, h $\Delta 1$ and h $\Delta 3$ mutants, which lack ARE motifs, were ineffective in reducing reporter activity. Similar results were obtained with mouse MR 3'-UTR mutants (Supplemental Figure 4). To assess direct binding of Tis11b to the ARE-containing sequences, ribonucleoprotein immunoprecipitation (RNP-IP) was performed in HEK293T cells transfected with Tis11b and Luc-3'-UTR plasmids (full-length or truncated MR 3'-UTR) (Figure 1C). Although cross-linked immunoprecipitated RNP complexes were detected with the

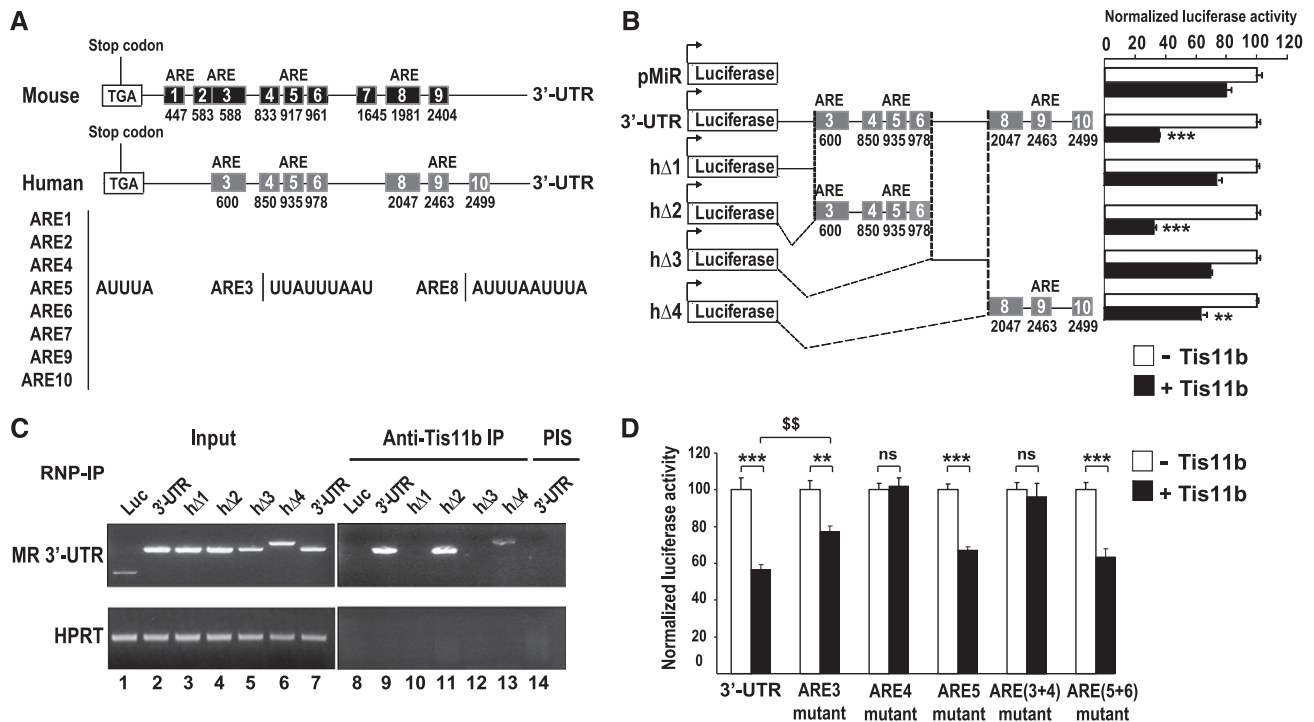


Figure 1. Tis11b represses MR 3'-UTR-driven luciferase activity through its physical interaction with AREs. (A) Location and nucleotide sequences of ARE motifs in mouse (black boxes) and human (gray boxes) MR 3'-UTR positioned after the stop codon TGA 1. (B) Identification of ARE motifs required for Tis11b interaction. HEK293T cells were transiently transfected as described in Concise Methods. Luc activities of Luc mRNA (pMiR) and Luc fused to full-length or truncated MR 3'-UTR (20 ng/well of 96-well plates) were measured in the absence (white) or presence (black) of Tis11b (20 ng). Values are means±SEMs of 16 independent experiments performed in duplicate. Statistical significance was $**P<0.01$ or $***P<0.001$ compared with the Luc activity of pMiR vector without MR 3'-UTR and in the presence of Tis11b. (C) RNP-IP with anti-Tis11b IgGs from HEK293T cells transfected with pTarget-Tis11b (100 ng) and pMiR-Luc-MR 3'-UTR (500 ng) vectors. (Left panel) Inputs (lanes 1–7) show amplification of Luc transcript without and with full-length or truncated MR 3'-UTR (hΔ1, hΔ2, hΔ3, and hΔ4). (Right panel) Amplification of Luc-MR 3'-UTR, Luc-MR-hΔ2, and Luc-MR-hΔ4 transcripts in RNP-IP from Tis11b-transfected cells (lanes 9, 11, and 13). Negative control with preimmune serum (PIS) is in lane 14. (Lower panels) Quantitative RT-PCR analysis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA in (left panel) inputs and (right panel) RNP-IP. A representative experiment of three independent experiments is presented. (D) HEK293T cells were transfected with empty or pTarget-Tis11b (50 ng/well of 12-well plates) vectors with 10 ng wild-type or mutant pMiR-Luc-3'-UTR. Full-length 3'-UTR was mutated to invalidate one (mutARE3, -4, or -5) or both adjacent AREs (mutARE3+4 and mutARE5+6). Data are means±SEMs ($n=4-8$ experiments performed in duplicate). Statistical significance was $**P<0.01$ or $***P<0.001$ from respective Luc activity in the absence of Tis11b as indicated; $^{**}P<0.01$ indicates significant difference from Luc activity of pMiR-wild-type 3'-UTR in the presence of Tis11b.

entire MR 3'-UTR as well as hΔ2 and hΔ4 mutants, no specific signal was found with transcripts lacking AREs, such as Luc, hΔ1, or hΔ3, suggesting that Tis11b physically targets ARE-containing sequences. Given that Tis11b repressed Luc-hΔ2 3'-UTR and strongly interacted with hΔ2 region, we mutated ARE3, -4, -5, and -6 individually or in combination to determine which AREs were pivotal within hΔ2 sequence. Luciferase activities of single mutants ARE3 and ARE5 were still significantly reduced by Tis11b, whereas the mutant ARE4 lost its ability to be repressed by Tis11b (Figure 1D). Mutations of both ARE3 and ARE4 abrogated Tis11b-mediated repression of luciferase activity as observed for mutations of ARE4 alone, whereas mutations of both ARE5 and ARE6 had no significant effect. Altogether, these results indicate that ARE4 is the crucial core element in hMR 3'-UTR for the repression by Tis11b. However, Tis11b-induced decrease in

mutant ARE3 luciferase activity was significantly impaired compared with the one driven by the wild-type 3'-UTR ($P<0.01$), suggesting that ARE3 may somehow also contribute to Tis11b inhibitory action.

Hypertonicity Induces Tis11b-Mediated Decrease of MR mRNA Half-Life in Renal Cells

In the renal Na^+ -transporting KC3AC1 cells, endogenous Tis11b is expressed at low level under isotonic conditions. A 6-fold increase in Tis11b protein expression was observed in raffinose-treated KC3AC1 cells (Figure 2A, hyper). Detection of several bands for Tis11b is consistent with multiphosphorylated states of the protein.¹⁹ Of particular interest, expression of the other members of the TTP family, Tis11d and Tis11, under hypertonic stress were reduced or remained unchanged at both mRNA and protein levels, respectively

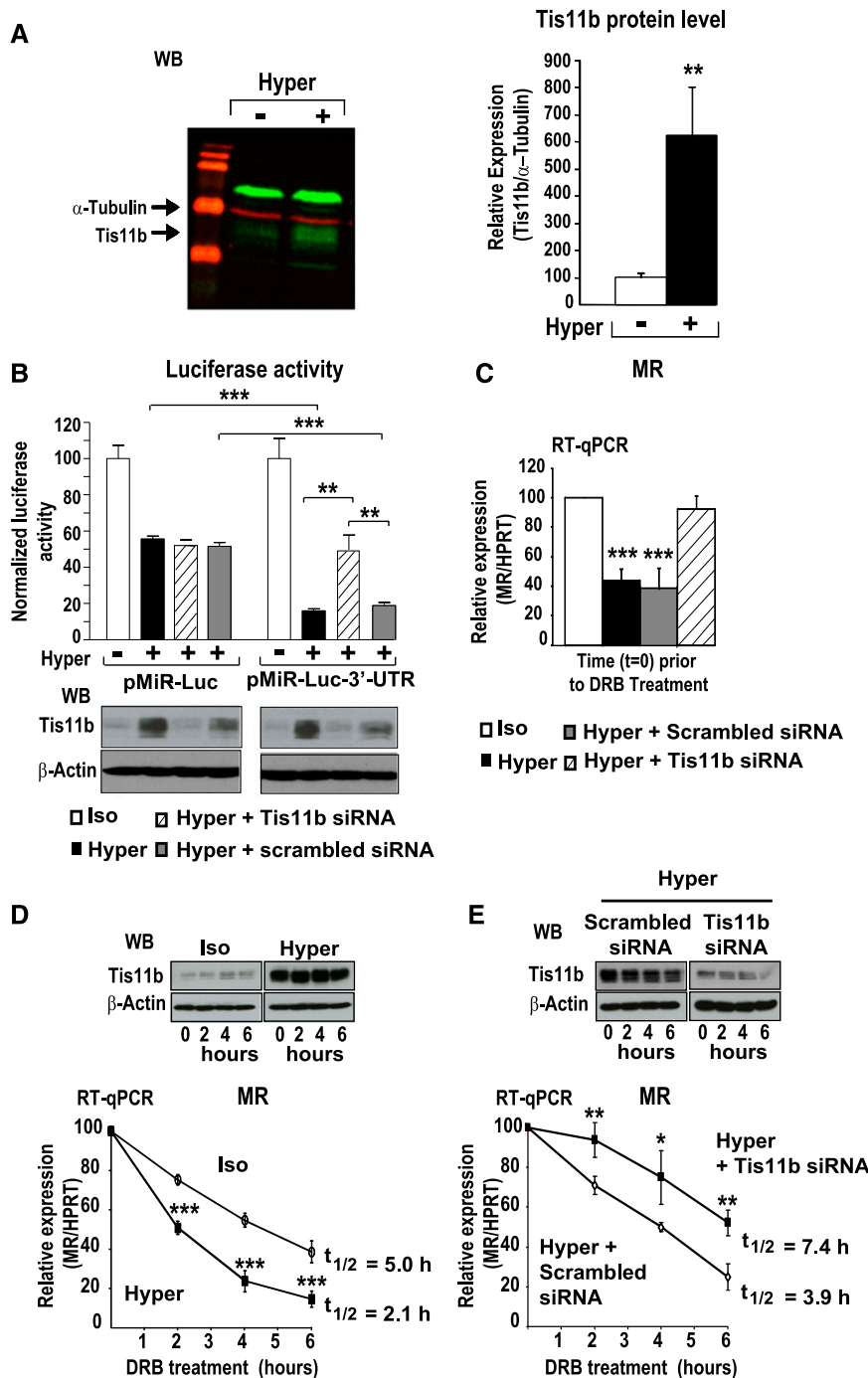


Figure 2. Hypertonicity-induced Tis11b mediates MR transcript repression in renal cells. (A) Hypertonicity induces endogenous Tis11b expression in KC3AC1 cells. KC3AC1 cells were cultured under isotonic (iso) or hypertonic (hyper) conditions for 18 hours, and then, protein extracts were analyzed by Western blot. Quantified signals are means \pm SEMs ($n=6$). WB, Western blot analysis of Tis11b expression at indicated time points. **Significantly different from Tis11b expression under isotonicity with $P<0.01$. (B) Hypertonicity-induced Tis11b is involved in the repression of MR 3'-UTR-driven luciferase activity. (Upper panel) KC3AC1 cells were transfected with pMIR-Luc or pMIR-Luc-3'-UTR vectors (50 ng per 12-well plate) under isotonic (white bars) or hypertonic (black bars) conditions in the presence of Tis11b siRNA (hatched bars) or scrambled siRNA (gray bars). Under hypertonicity, Luc activity of pMIR-Luc-3'-UTR was significantly lower than the one of pMIR-Luc in the absence or

(Supplemental Figure 5). It is, therefore, very unlikely that Tis11d or Tis11 is involved in the downregulation of renal MR mRNA. To examine Tis11b functionality, pMIR-Luc and pMIR-Luc-3'-UTR plasmids were transfected in KC3AC1 cells submitted or not to hypertonic stress in the presence of scrambled small interfering RNA (siRNA) or Tis11b siRNA. As shown in Figure 2B, hypertonicity markedly decreased pMIR-Luc-3'-UTR activity (approximately 80% repression) given that MR 3'-UTR bears several AREs. Importantly, knockdown of Tis11b increased luciferase activity in hypertonicity-treated cells to the levels observed in the absence of MR 3'-UTR, whereas scrambled siRNA had no effect (Figure 2B, right panel). Of note, pMIR-Luc activity was also decreased; however, it was to a lesser extent (by approximately 40% under hypertonicity) whether Tis11b expression was knocked down or not (Figure 2B, left panel), suggesting that luciferase expression was likely affected at the transcriptional level

presence of scrambled siRNA (** $P<0.001$). Luc activity of pMIR-Luc-3'-UTR measured under hypertonicity was also significantly lower than the one measured in the presence of Tis11b siRNA (** $P<0.01$). Values are means \pm SEMs from three independent experiments performed in duplicate. (C) Silencing Tis11b expression prevents hypertonicity-induced decrease of endogenous MR mRNA in renal cells. KC3AC1 cells were transfected with scrambled or Tis11b siRNA and then exposed to hypertonicity. MR mRNA steady state levels are quantified at time 0 before 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) addition. Data are means \pm SEMs ($n=4$; *** $P<0.001$, Hyper versus Iso and Tis11b siRNA versus scrambled siRNA). RT-qPCR, quantitative RT-PCR. (D and E) MR transcript $t_{1/2}$ in KC3AC1 cells exposed to (D) isotonic or hypertonic conditions or (E) hypertonic conditions in the presence of scrambled or Tis11b siRNA. DRB (10 μ g/ml) was added to block transcription. MR mRNA values were plotted as the percentage of the initial value against time. Data are means \pm SEMs ($n=4-8$). (D) *** $P<0.001$ indicates significant difference from the corresponding time point under isotonicity. (E) * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ indicate significant difference from the corresponding time point under hypertonicity in the presence of scrambled siRNA.

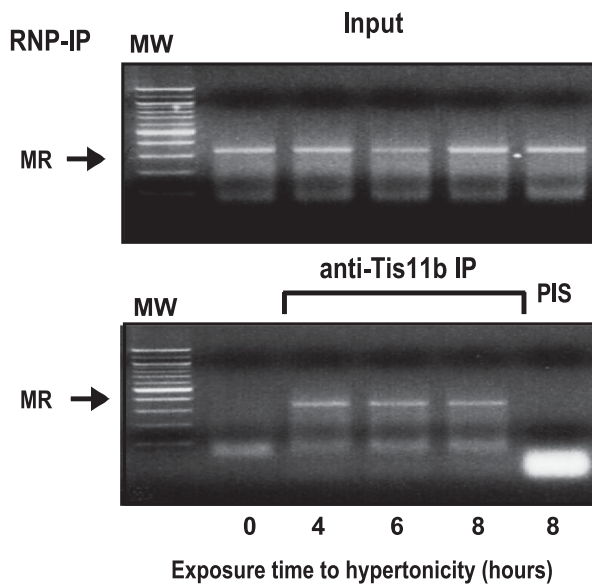


Figure 3. Hypertonicity elicits Tis11b interaction with endogenous MR 3'-UTR. KC3AC1 cells were exposed to hypertonicity (0–8 hours), and RNP-IP was performed as previously described.²⁴ Input lanes show amplification of MR mRNA in nonimmunoprecipitated lysates. Lower panel shows RNP-IP complexes between Tis11b and MR mRNA in response to hypertonicity. A representative experiment of two independent experiments is shown. MW, molecular weight; PIS, preimmune serum.

independent from Tis11b and MR 3'-UTR. These results indicate that hypertonicity-induced Tis11b is involved in the destabilization of MR ARE-containing luciferase transcript. We next showed that hypertonicity induced a 60% decrease of endogenous MR transcript levels in KC3AC1 cells (Figure 2C). This effect was prevented by Tis11b knockdown with specific siRNA, indicating that MR mRNA was tightly controlled by hypertonicity-induced Tis11b expression. We further investigated the role of Tis11b in MR mRNA stability. Under isotonicity, KC3AC1 cells displayed a low Tis11b expression and a $t_{1/2}$ for MR mRNA of 5 hours. This half-life was markedly decreased to 2.1 hours when Tis11b expression was induced by hypertonicity (Figure 2D). Likewise, transfection of KC3AC1 cells with scrambled siRNA did not alter hypertonicity-elicited MR mRNA half-life ($t_{1/2}$ of 3.9 hours). In contrast, Tis11b knockdown both significantly reduced hypertonicity-stimulated Tis11b expression (Figure 2E, upper panel) and slowed down MR transcript turnover as revealed by a longer $t_{1/2}$ of 7.4 hours (Figure 2E, lower panel).

Endogenous Tis11b Physically Interacts with MR Transcript

To examine whether MR transcript was a direct target of Tis11b, we performed RNP-IP assays in KC3AC1 cells exposed to hypertonicity (Figure 3). Figure 3, upper panel shows amplification of MR transcript in input samples. Anti-Tis11b antibody immunoprecipitated RNP complexes containing

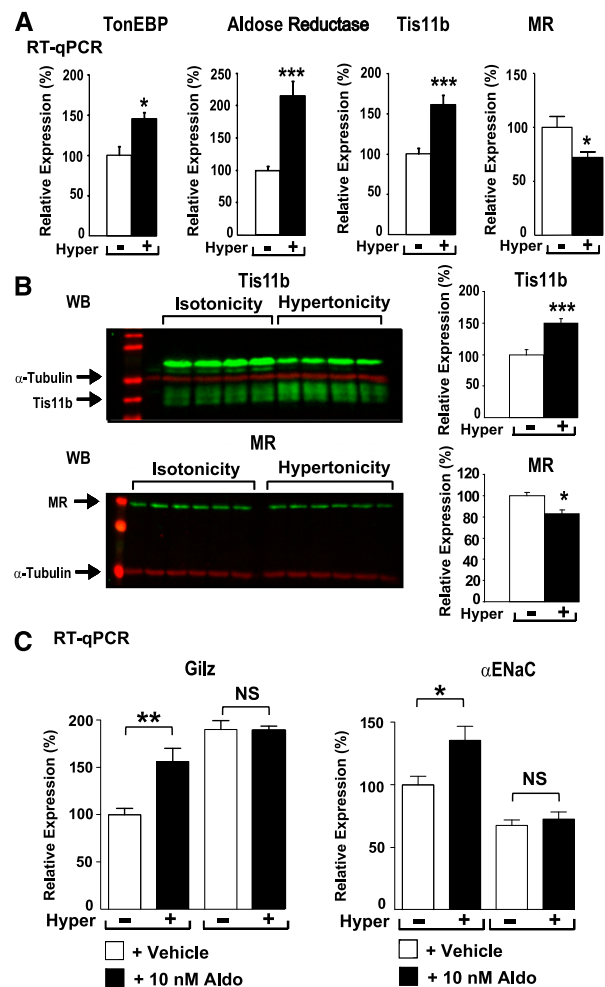


Figure 4. Hypertonicity compromises MR-mediated gene expression. KC3AC1 cells cultivated on filters were submitted or not to hypertonicity at their apical face for 6 hours for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) or 18 hours for Western blot (WB). (A) RT-qPCR analysis of TonEBP, Aldose Reductase, Tis11b, and MR expression by RT-qPCR. Data are means \pm SEMs ($n=6-36$). (B) WB analysis of MR and Tis11b. Data are means \pm SEMs ($n=6-10$). (C) Hypertonicity prevented aldosterone-induced α ENaC and Gilz expression. KC3AC1 cells were stimulated with 10 nM aldosterone for 1 hour in isotonic or hypertonic conditions. α ENaC and Gilz expressions were quantified by RT-qPCR. Data are means \pm SEMs ($n=18-24$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ indicate significant difference from (A and B) the corresponding value under isotonicity or (C) untreated cell conditions.

endogenous MR 3'-UTR as early as 4 hours after raffinose exposure (Figure 3, lower panel), whereas no specific MR amplification was observed under basal conditions (0 hours) or with preimmune serum. This result showed that hypertonicity-induced Tis11b protein physically interacts with MR mRNA expressed in KC3AC1 cells.

Hypertonicity Compromises MR Signaling

To examine the functional consequences of Tis11b-mediated destabilization of MR mRNA, KC3AC1 cells were cultivated on

filters to mimic vectorial hydroelectrolytic transports across polarized epithelial cells. Apical surface of cells was exposed to raffinose to mimic an increase of the luminal tonicity, whereas their basolateral compartment was bathed with isotonic medium. Hypertonicity induced a 1.5-fold increase in TonEBP expression, leading to a 2-fold increase in Aldose Reductase target gene expression (Figure 4A) and a 1.5-fold increase in Tis11b mRNA levels and resulting in a significant reduction of MR transcript levels. Likewise, hypertonicity stimulated Tis11b protein expression, which was accompanied by a slight but significant 20% reduction of MR protein (Figure 4B). Finally, aldosterone treatment of KC3AC1 cells for 1 hour induced a significant 1.5-fold increase in α ENaC and Gilz expression under isotonic conditions (Figure 4C), but such stimulatory effects were abolished after apical exposure to raffinose. Similar results were obtained with *sgk1* expression, but its mRNA levels dramatically increased on hypertonic stress (eight times) (Supplemental Figure 6) as already reported.²⁰ Collectively, our findings indicate that hypertonicity compromised MR signaling in renal cells.

Challenging the Osmotic Corticopapillary Gradient Modulates Tis11b and MR Expression *In Vivo*

To address the physiologic relevance of our *in vitro* findings, the osmotic corticopapillary gradient was altered by submitting mice to 18 hours of water deprivation, 3 hours of diuretic (furosemide or indapamide) treatment, or high Na⁺ diet for 2 weeks; such conditions are known to be associated with increased Na⁺ fluxes in the distal nephron. Under basal conditions, a weak but positive cytoplasmic Tis11b labeling was observed in proximal and distal tubules but not glomeruli in the renal cortex (Figure 5A), whereas strong MR nuclear staining was detected in the distal nephron (Figure 5C). After high Na⁺ diet, Tis11b was dramatically increased in renal tubules (Figure 5B), with a concomitant reduction of MR in the nuclei of cortical collecting cells (Figure 5D). To quantify Tis11b and MR expression, Western blot analysis was performed on whole-kidney samples using multiplex detection of MR and Tis11b (Figure 5E, upper panel). Tis11b expression was slightly increased, although not significantly, by water deprivation, whereas furosemide, indapamide, and high Na⁺ diet (Na⁺) dramatically stimulated Tis11b expression by four- to 6-fold. In contrast, a strong decrease in MR expression was observed (Figure 5E, lower panels). Altogether, we showed that, *in vivo*, an altered renal osmotic corticopapillary gradient associated with increased extracellular tonicity enhanced renal Tis11b expression, which negatively correlated with a concomitant repression of MR expression.

DISCUSSION

Accumulating evidence reveals that, other than transcription, post-transcriptional mechanisms constitute a second regulatory level of gene expression. Notably, transcript

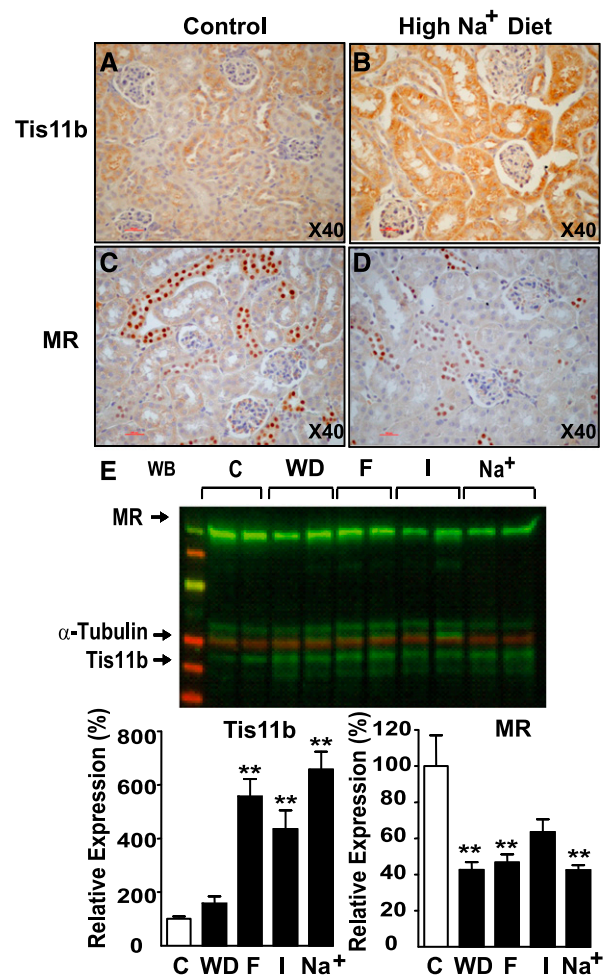


Figure 5. High extracellular tonicity concomitantly increases Tis11b and decreases MR expression in mouse kidneys. Immunohistochemical detection of (A and B) Tis11b and (C and D) MR in the kidneys of (A and C) control and (B and D) high Na⁺ diet-fed mice. High Na⁺ diet increased renal Tis11b expression, whereas it decreased MR expression. (E) WB analysis of renal Tis11b and MR expression in control mice (C), mice submitted to water deprivation (WD), mice treated with furosemide (F) or indapamide (I), and mice fed high Na⁺ diet. Data are means±SEMs (*n*=5–7 animals). ***P*<0.01 indicates significant difference from control.

stability and translation efficiency are highly regulated steps, allowing the expression level of key proteins to be rapidly adjusted to cellular environment modifications. Here, we characterized a novel hypertonicity-triggered mechanism by which the RNA binding protein Tis11b destabilizes MR mRNA, leading to decreased MR expression. Tis11b is a member of the TTP family comprising Tis11 and Tis11d, which all regulate short-lived mRNA fate by their abilities to target ARE-containing mRNA to rapid degradation.¹⁸ Tis11b was shown to regulate steroidogenic acute regulatory protein mRNA stability¹⁹ and vascular endothelial growth factor in adrenocortical cells.²¹ Here, we identified seven to nine AREs located in MR 3'-UTR that were highly conserved

between species. We showed that, by using site-directed mutagenesis, ARE3 (UUAUUUAAU) contributes to Tis11b-mediated repression of MR transcript, whereas ARE4 (UAUUUAA) is the crucial cis-acting element in this repression. AUUUA motifs have been also identified in the 3'-UTR of other steroid receptors, such as glucocorticoid receptor α and $-\beta$ ²² and estrogen receptor α ,²³ accounting for the destabilization of their transcripts. Interestingly, we were also able to show that endogenous glucocorticoid receptor expression in renal KC3AC1 cells was also slightly reduced by hypertonic stress (data not shown). Other RNA binding proteins might bind these AREs, which is exemplified by human antigen R (HuR) that acts as a positive regulator antagonizing Tis11b function.²⁴ Given that MR mRNA levels increased on hypotonic stress in KC3AC1 cells,¹⁷ future analysis of HuR binding on MR 3'-UTR and subsequent consequences on MR transcript stability and signaling are warranted.

In cortical collecting KC3AC1 cells, binding of Tis11b to MR 3'-UTR accelerated MR transcript decay. Our study, thus, constitutes the first example of a steroid receptor mRNA turnover tightly controlled by hypertonicity-stimulated expression of Tis11b. Functional consequences of Tis11b-mediated destabilization of MR transcript were assessed in renal cells cultivated on filters under asymmetric culture conditions to be closer to the *in vivo* situation. Because basolateral osmolality may not change physiologically for cells in the cortex, we modified apical extracellular hypertonicity and showed that an increased TonEBP expression enhanced Tis11b expression, which in turn, reduced MR mRNA levels. Note that, as a result of accelerating MR degradation with halving the MR mRNA $t_{1/2}$, a statistically significant difference in MR mRNA and protein abundance occurs, leading to a compromised MR signaling with blunted responses in terms of aldosterone-regulated gene expression (Gilz and α ENaC). Because ENaC channel constitutes the rate-limiting step for Na⁺ reabsorption, Na⁺ transport might be rapidly affected when luminal extracellular tonicity increased in the distal tubules.

Although high Na⁺ diet condition and diuretic treatments are not likely to increase luminal osmolality to near 500 mOsM/kg, we interestingly showed *in vivo* that increased sodium fluxes in the distal part of the nephron and/or altered dilution capacities were associated with an increased renal Tis11b expression and a parallel decreased MR expression in the distal nephron.

Our results might be reminiscent of pathophysiological situations, in which the renal corticopapillary gradient is altered during osmotic diuresis, such as diabetes mellitus or tubular dysfunction. This *in vivo* mechanism at the organismal level may prevent accentuation of hypernatremia and rise in extracellular tonicity.

Altogether, our study provides new insights for better comprehension of the regulatory mechanisms controlling renal MR expression. We believe that our findings may have major physiologic impact, notably during renal development. Indeed, we have previously shown a physiologic renal aldo-

sterone resistance in the neonatal period associated with a low MR expression in the kidney of both mice and humans at birth.⁷ Because the composition of the amniotic fluid, notably Na⁺ concentration, changes along gestation, a similar mechanism involving hypertonic stress and Tis11b may account for the control of renal MR expression in the fetus. Investigation on renal Tis11b ontogenesis during development and its expression pattern along nephronic segments may be particularly relevant.

We thus propose that Tis11b represents a physiologic regulator of renal MR abundance. It will be critical to establish whether osmotic stress may modulate MR abundance in other mineralocorticoid-sensitive tissues, not only in ionic transporting epithelia (colon and inner ear) but also cardiomyocytes, endothelial cells, adipocytes, or neurons, in which MR controls major biologic processes through rapid signaling. Osmotic stress and possibly, other stresses, including oxidative stress, oxygen depletion, and energy shortage are likely contributing to the rapid regulation of MR expression. MR abundance does constitute a key molecular determinant for mineralocorticoid signaling pathway and seems to be profoundly affected in various pathophysiological situations. Additional elucidation of the molecular mechanisms impacting MR-mediated signaling may open new therapeutic opportunities.

CONCISE METHODS

Cell Culture

HEK293T cells were cultured in DMEM with 10% FCS (Biowest), 2 mM glutamine, 20 mM Hepes (pH 7.4), 100 unit/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. All reagents were from PAA. KC3AC1 cells were cultured at 300 mOsM/kg (Isotonicity) as previously described.¹⁷ Hypertonic conditions (500 mOsM/kg) were achieved by adding 0.2 M raffinose (Sigma-Aldrich). Minimal medium lacking dexamethasone and serum was used to study aldosterone action (Acros Organics).

Plasmid Constructs

Murine and human MR 3'-UTRs (full-length and truncated sequences) were amplified by PCR from genomic DNA using specific primers (Supplemental Table 1), in which SpeI and SacI restriction sites were introduced to facilitate cloning into the pMIR-Report plasmid (Life Technologies). For ARE mutants, AUUUA was mutated to AggUA using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) (Supplemental Table 1). Tis11b-encoding pTarget vector was described previously.²¹ For pTarget-Tis11b-RR plasmid, the cysteine residues at positions 120 and 158 (TGC) were changed to arginine (CGC) using QuickChange site-directed mutagenesis. All plasmids were sequenced to verify nucleotide identity.

Transfection Assay

HEK293T cells were transfected with the indicated doses of luciferase constructs and either empty or Tis11b-encoding pTarget vector using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Luciferase activities, nor-

malized to β -galactosidase or renilla luciferase activities, were performed 24 hours post-transfection as described.²⁵

RNP-IP

RNP-IP was performed as previously described²⁵ in either HEK293T cells transfected with Luc-MR 3'-UTR constructs or KC3AC1 cells exposed to hypertonicity. Luc-MR 3'-UTR, MR, or hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase mRNA were amplified using specific primers (Supplemental Table 1).

RNA Interference

KC3AC1 cells were transfected two times (days 6 and 7 of culture) with 50 nM Tis11b siRNA or scrambled siRNA (s2090 and 4390843; Life Technologies) using RNAimax reagent (Life Technologies). Cells were exposed overnight to hypertonicity, and 10 μ g/ml 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole was added to determine MR mRNA half-life.

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR was performed as described previously.¹⁷ After DNase treatment (Biolabs), RNA was reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Samples were analyzed by quantitative RT-PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) with the primers indicated (Supplemental Table 1) and a StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies). Relative expression in a given sample was calculated as a ratio (attomoles specific gene per femtomole 18S or hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase).

Western Blot and Immunohistochemistry

Protein extracts were processed for multiplex detection of Tis11b or MR protein together with α -tubulin or β -actin protein for loading normalization; 5- μ m sections of paraffin-embedded kidneys were deparaffinized in xylene and rehydrated. Antigen retrieval was done by microwaving (3 \times 5 minutes) in citrate buffer (pH 6). Sections were subsequently treated as described previously.²⁶ Antibody sources and dilutions are detailed in Supplemental Table 1.

Investigations in Mice

Animals had free access to water except for the water deprivation group, which did not receive any water for 18 hours. Mice were either subjected to a high Na⁺ diet (Genestil) for 2 weeks or received an intraperitoneal injection of furosemide (40 mg/kg; Renaudin) or indapamide (3 mg/kg; Sigma-Aldrich) for 3 hours. Animals ($n=6-7$ per group) were euthanized, and kidneys were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for subsequent analyses. Mice were bred according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health. The animal facility was granted approval (C94-043-12) by the Ministère de l'Agriculture, France. All procedures were approved by the local ethics committee Consortium des Animaleries Paris Sud (2012-021).

Statistical Analyses

Data are means \pm SEMs. One-way ANOVA or Mann-Whitney U test was used when appropriate to determine significant differences

(GraphPad Prism software). A P value of 0.05 was considered as statistically significant (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; §§ $P<0.01$; *** $P<0.001$).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. N. Binart and Dr. P. Kamenický for their critical reading of the manuscript. We thank M. Messina and N. Ba for their technical help. We are also grateful to Dr. M. Schmidlin and Dr. C. Gomez-Sanchez for the gift of Tis11b and MR antibodies.

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Université Paris-Sud and Agence Nationale de la Recherche Grant 11-BSV1-028-01. I.L. is the recipient of a Cardiovasculaire-Obésité-Rein-Diabète-Domaine d'Intérêt Majeur (Région Ile-de-France) Fellowship.

DISCLOSURES

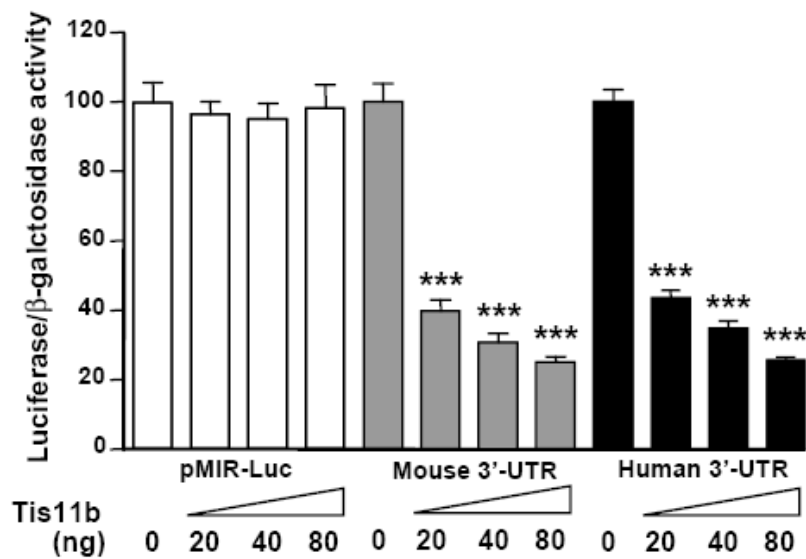
None.

REFERENCES

1. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinier L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombès M: The mineralocorticoid receptor: Insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 5: e012, 2007
2. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-467, 1994
3. Verrey F: Transcriptional control of sodium transport in tight epithelial by adrenal steroids. *J Membr Biol* 144: 93-110, 1995
4. Bhalla V, Soundararajan R, Pao AC, Li H, Pearce D: Disinhibitory pathways for control of sodium transport: Regulation of ENaC by SGK1 and GILZ. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F714-F721, 2006
5. Quinkler M, Zehnder D, Eardley KS, Lepenies J, Howie AJ, Hughes SV, Cockwell P, Hewison M, Stewart PM: Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria. *Circulation* 112: 1435-1443, 2005
6. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawarazaki W, Kurihara H, Tanaka H, Miyoshi J, Takai Y, Fujita T: Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: Implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med* 14: 1370-1376, 2008
7. Martinier L, Viengchareun S, Delezoide AL, Jaubert F, Sinico M, Prevot S, Boileau P, Meduri G, Lombès M: Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* 150: 4414-4424, 2009
8. Geller DS, Zhang J, Zennaro MC, Vallo-Boado A, Rodriguez-Soriano J, Furu L, Haws R, Metzger D, Botelho B, Karaviti L, Haqq AM, Corey H, Janssens S, Corvol P, Lifton RP: Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1: Mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults. *J Am Soc Nephrol* 17: 1429-1436, 2006
9. Wang X, Skelley L, Cade R, Sun Z: AAV delivery of mineralocorticoid receptor shRNA prevents progression of cold-induced hypertension and attenuates renal damage. *Gene Ther* 13: 1097-1103, 2006
10. Zennaro MC, Le Menuet D, Lombès M: Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: Evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via non-classical mechanisms. *Mol Endocrinol* 10: 1549-1560, 1996

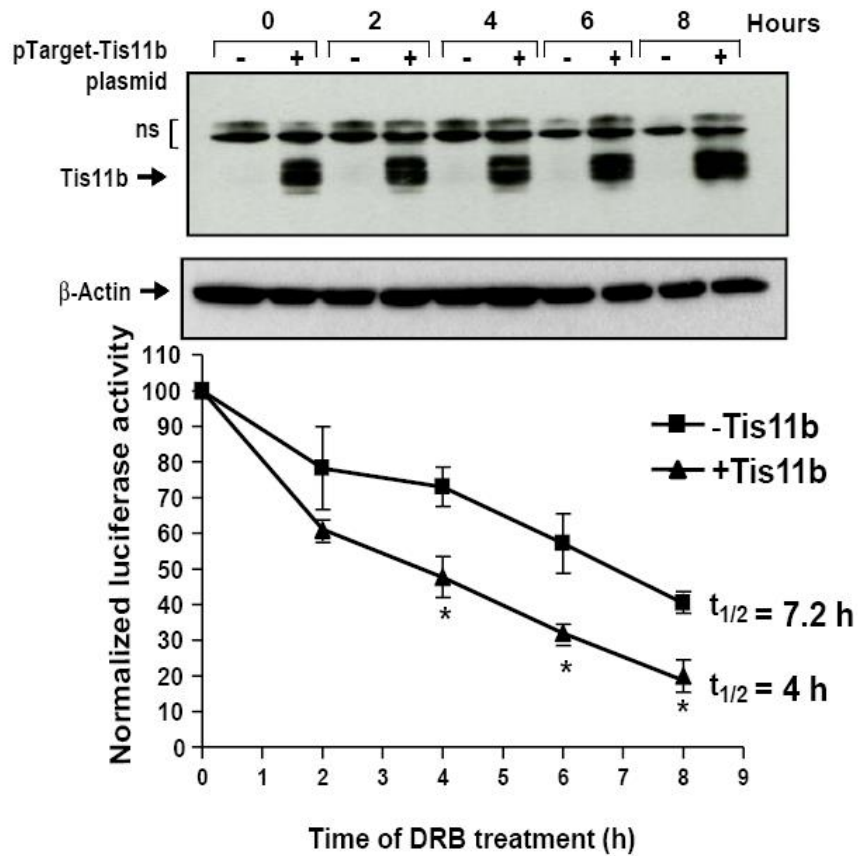
11. Pascual-Le Tallec L, Lombès M: The mineralocorticoid receptor: A journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol* 19: 2211–2221, 2005
12. Faresse N, Vitagliano JJ, Staub O: Differential ubiquitylation of the mineralocorticoid receptor is regulated by phosphorylation. *FASEB J* 26: 4373–4382, 2012
13. Fenton RA, Knepper MA: Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev* 87: 1083–1112, 2007
14. Doucet A, Katz AI: Mineralocorticoid receptors along the nephron: [³H] aldosterone binding in rabbit tubules. *Am J Physiol* 241: F605–F611, 1981
15. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM: Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2538–2542, 1999
16. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI: Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87: 1441–1474, 2007
17. Viengchareun S, Kamenicky P, Teixeira M, Butlen D, Meduri G, Blanchard-Gutton N, Kurschat C, Lanel A, Martinerie L, Sztal-Mazer S, Blot-Chabaud M, Ferrary E, Cherradi N, Lombès M: Osmotic stress regulates mineralocorticoid receptor expression in a novel aldosterone-sensitive cortical collecting duct cell line. *Mol Endocrinol* 23: 1948–1962, 2009
18. Blackshear PJ: Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans* 30: 945–952, 2002
19. Duan H, Cherradi N, Feige JJ, Jefcoate C: cAMP-dependent post-transcriptional regulation of steroidogenic acute regulatory (STAR) protein by the zinc finger protein ZFP36L1/TIS11b. *Mol Endocrinol* 23: 497–509, 2009
20. Chen S, Grigsby CL, Law CS, Ni X, Nekrep N, Olsen K, Humphreys MH, Gardner DG: Tonicity-dependent induction of Sgk1 expression has a potential role in dehydration-induced natriuresis in rodents. *J Clin Invest* 119: 1647–1658, 2009
21. Ciais D, Cherradi N, Bailly S, Grenier E, Berra E, Pouyssegur J, Lamarre J, Feige JJ: Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene* 23: 8673–8680, 2004
22. Schaaf MJ, Cidlowski JA: AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids* 67: 627–636, 2002
23. Kenealy MR, Flouriot G, Sonntag-Buck V, Dandekar T, Brand H, Gannon F: The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. *Endocrinology* 141: 2805–2813, 2000
24. Cherradi N, Lejczak C, Desroches-Castan A, Feige JJ: Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Mol Endocrinol* 20: 916–930, 2006
25. Chamboredon S, Ciais D, Desroches-Castan A, Savi P, Bono F, Feige JJ, Cherradi N: Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA: A new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 22: 3366–3378, 2011
26. Planel S, Salomon A, Jalinot P, Feige JJ, Cherradi N: A novel concept in antiangiogenic and antitumoral therapy: Multitarget destabilization of short-lived mRNAs by the zinc finger protein ZFP36L1. *Oncogene* 29: 5989–6003, 2010

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2013091023/-/DCSupplemental>.



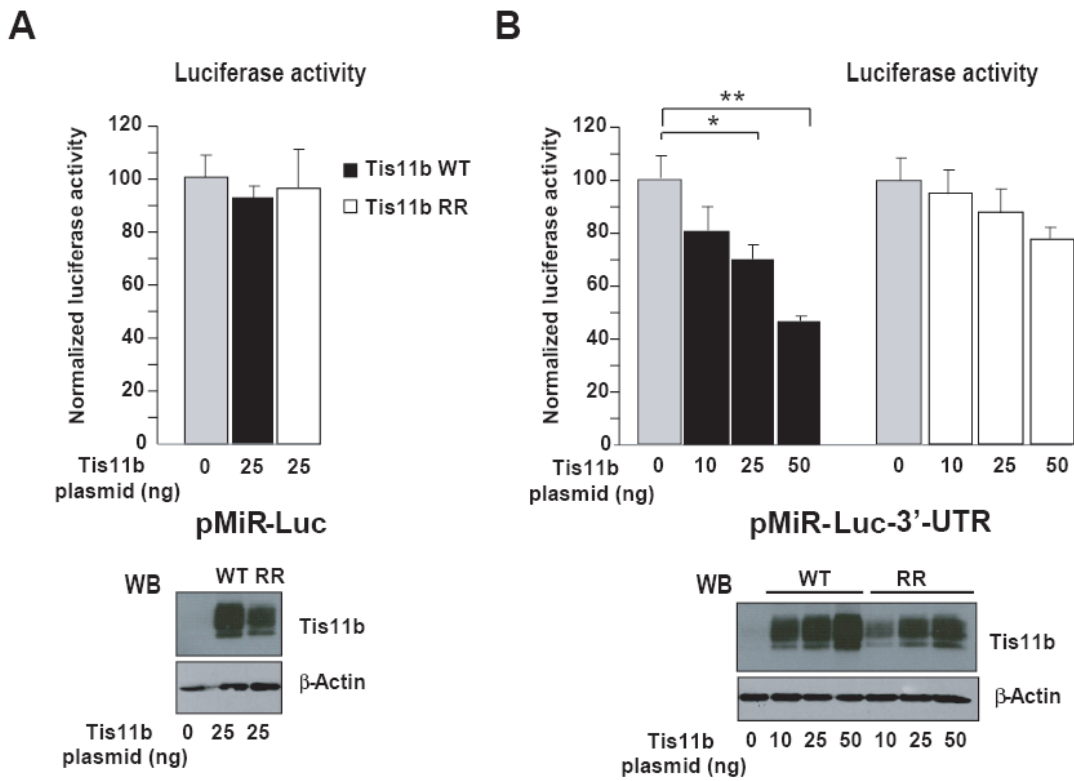
Supplemental Fig. S1

Fig. S1: Dose-dependent effect of Tis11b on MR-3'-UTR-driven luciferase activity. Increasing doses of Tis11b plasmid were co-transfected with pMIR-Luc or pMIR-Luc-3'-UTR (20 ng/96-well plate) in HEK293T cells. Luciferase activities were measured and normalized to β-Galactosidase activities. Data are means ± SEM, n=14. ***p<0.001 indicates significant difference from the corresponding Luc activity in the absence of Tis11b.



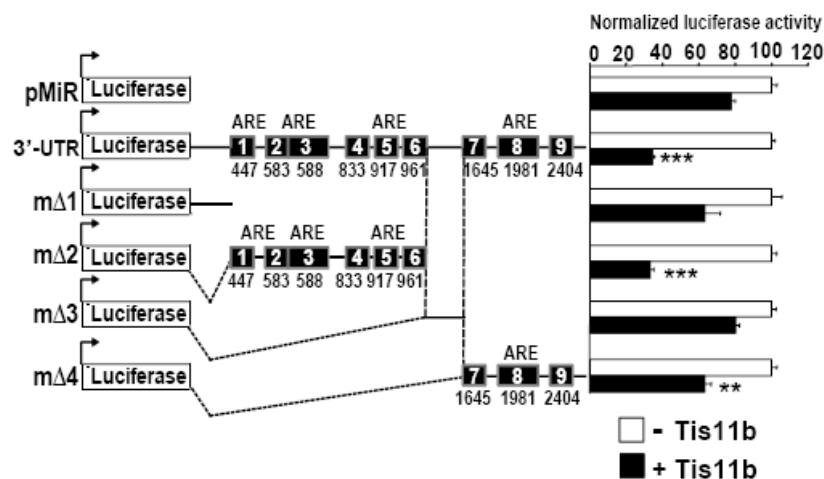
Supplemental Fig. S2

Fig. S2. Overexpression of Tis11b decreases the half-life of Luc-3'-UTR transcript. HEK293T cells were co-transfected with pMIR-Luc-3'-UTR (10 ng) and pTarget-empty or pTarget-Tis11b plasmids (50 ng). Twenty four hours following transfection, DRB was added for various periods of time. Total protein or RNA extracts were used to analyze Tis11b overexpression by western blot (upper panel) or Luc-3'-UTR mRNA expression by RT-qPCR (lower panel). * $p < 0.05$ indicates significant difference from the corresponding time point in the absence of Tis11b.



Supplemental Fig. S3

Fig. S3. Impairment of Tis11b binding to ARE within MR 3'-UTR prevents its inhibitory effect on Luciferase activity **A:** HEK293T cells were cotransfected with pMIR-Luc vector in the absence (grey bars) or in the presence of 25 ng Tis11b WT (black bars) or 25 ng of its double zinc-finger mutant Tis11b-RR (white bars). **B:** HEK293T cells were cotransfected with pMIR-Luc-3'-UTR in the absence (grey bars) or in the presence of increasing doses (from 10 to 50 ng) of Tis11b WT (black bars) or Tis11b-RR (white bars). Luciferase activities were measured and data are means \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. Statistical significance was * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ from respective Luc activity in the absence of Tis11b as indicated. Lower panels illustrate western blot analysis of Tis11b WT or Tis11b RR of the corresponding luciferase assays.

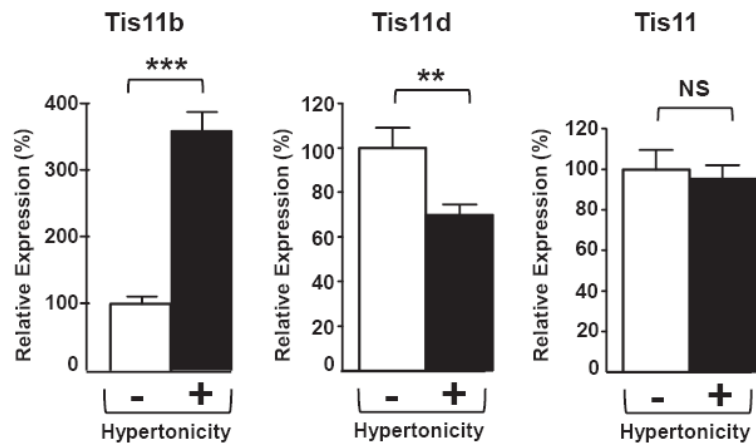


Supplemental Fig. S4

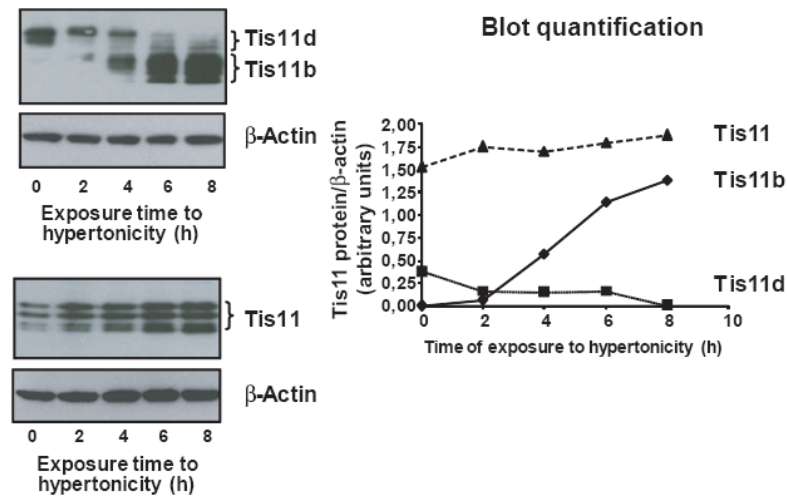
Fig. S4. Identification of the ARE motifs required for Tis11b activity on mouse MR 3'UTR.

HEK293T cells were transiently transfected as described in Methods. Luciferase activities of Luc mRNA without any 3'-UTR and Luc fused to mouse MR 3'-UTR or its truncated sequences were measured in the absence or in the presence of Tis11b. Luciferase (Luc) activities of Luc mRNA (pMIR) and Luc fused to full-length or truncated MR 3'-UTR (20 ng/well of 96-well plates) were measured in the absence (white) or presence (black) of Tis11b (20 ng). Values are means \pm SEM of 16 independent experiments performed in duplicate. Statistical significance was ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$, compared to the Luc activity of pMIR vector without MR 3'-UTR and in the presence of Tis11b.

A



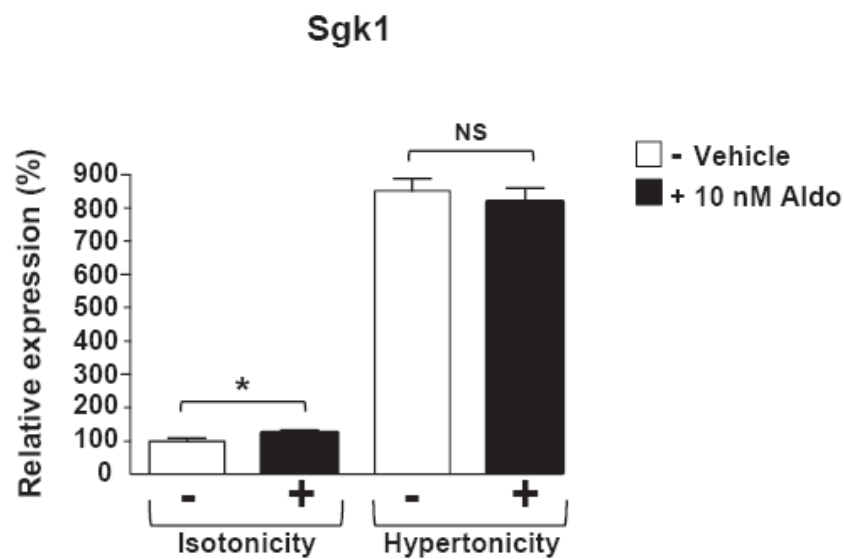
B



Supplemental Fig. S5

Fig. S5. Effect of hypertonicity on expression of Tis11 family members.

KC3AC1 cells were incubated under isotonic (white bars) or hypertonic conditions (black bars) for 6 h (RT-PCR) or 2-8 h (Western blots). **A:** RT-qPCR analysis of Tis11b, Tis11d and Tis11 expression. Data are means \pm SEM, n=12. Statistical significance was **p<0.01 or ***p<0.001, compared to the isotonic condition. NS = not significant. **B:** Western blot analysis of all Tis11 family members. Left panels: immunoblots. Right panel: quantification of the specific signals normalized to the β -actin.



Supplemental Fig. S6

Fig. S6. Hypertonicity prevented aldosterone-induced sgk1 expression

KC3AC1 cells were stimulated with 10 nM aldosterone for 1 h in isotonic or hypertonic conditions. Sgk1 expression was quantified by RT-qPCR. Data are means \pm SEM, n=24. *p<0.05 indicates significant difference from the corresponding value under isotonicity. NS= not statistically significant.

Table S1**Primer sequences for the cloning of the 3'-UTR (full-length and truncated sequences) of the MR transcript**

Name	Amplicon size (bp)	Sense primer	Antisense primer
Mice			
3'-UTR mMR	2780	GCTCACTTCCTGAGCATCGAATC	AGGCATCCTCTAGGCATC
mΔ2	799	GGAAGTTTTAACTATGCCATGTGGTT	CAGAACTACCGCTGGAGTCT
mΔ3	599	TCTTTGGTTGTCTCTAAGCCTTTCTA	GCCACTGTCTTGCTTATGTGA
mΔ4	1202	CAGCAGTCATGGCAGGAGGTA	AGGACAACAGGTGATTAAGTAAAGGA
Human			
3'-UTR hMR	2790	TTACAGCTGGTGAGCGAC	CCAGGTGTACCTACAGAC
hΔ2	519	GGTATACACACTCGTTAGCGTCCAT	AAGCGGGAGACCAAGAACAA
hΔ3	489	CATGTGGGAGAGGAGGTCCTT	CATACATTGCATCAGTGCCAAA
hΔ4	658	GGCAACATTACCTGTCTTTCA	TTGCTCCTAAAACAACAGGTGAT

NB : For the cloning of amplicons in pMIR-REPORTTM vectors, SpeI (ACTAGT) and SacI (GAGCTC) restriction sites were added to sense and antisense primer sequences, respectively.

Primer sequences used in site-directed mutagenesis to generate ARE mutants of hMR 3'-UTR

Name	Sense primer	Antisense primer
Mutant ARE 3	CGTTAGCGTCCATTTCTTAGGTAATTAGAATGGATAAG	CTTATCCATTCTAATTACCTAAGAAATGGACGCTAACG
Mutant ARE 4	GACAAAGATAGTACTTACCTAGTCTCCAGCAAATAG	GACAAAGATAGTACTTACCTAGTCTCCAGCAAATAG
Mutant ARE 5	GAACCGTTTACAGTGTAGGTAAGAAAGGGAAAGCTG	CAGCTTCCCTTTCTTACCTACACTGTAACCGGTTT
Mutant ARE 6	Sense: GAAAGCTGTGCCTTTTTAGCTTCATATCTAAGGTACCATTATTTTACAGTCTCT Antisense: AGAGACTGTAAAATAATGGTACCTTAGATATGAAGCTAAAAAGGCACAGCTTTC	

Primer sequences used in RT-qPCR

Name	Accession number	Amplicon size (bp)	Sense primer	Antisense primer
18S	X00686	66	CCCTGCCCTTTGTACACACC	CGATCCGAGGGCCTCACTA
MR	M36074	153	ATGGAAACCACACGGTGACCT	AGCCTCATCTCCACACCAAG
TonEBP	AY050663	127	CCTCTCCTCACCGTCGTCATC	CTCCCACCTCCTTCTATTCTG
AldoR	BC085310	79	GGCCGTGAAAGTTGCTATTGA	GGTCCCAGGCTGTGAGAT
Tis11b	NM_007564.3	100	CGACACACCAGATCCTAGTCCTT	TGCATAAAACTTCGCTCAAGTCA
αENaC	AF112185	150	GGACTGGAAAATCGGCTTCC	TAGAGCAGGCGAGGTGTCG
Tis11	NM_011756.4	101	AGCCCATCTGCCACTCTCT	AAACACCCCTGCCTCAAAGA
Tis11d	NM_001001806.2	99	GACCATTACAGGACCCAGAA	TTGAGGTTTGCCAGGGATTT
Sgk1	AF205855	150	TCACTTCTCATTCCAGACCGC	ATAGCCCAAGGCACTGGCTA
Gilz	NM_010286.3	79	CTGCTGTGGAGTTTGTGACATACTAG	CCAGGCAGGCACTTCTAAGCT
HPRT	164518913	80	ATGGACAGGACTGAACGCTTGTCT	TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG

Primer sequences used in RNP-IP

<i>Name</i>	<i>Amplicon size (bp)</i>	<i>Sense primer</i>	<i>Antisense primer</i>
mMR	799	GGAAGTTTAACTATGCCATGTGGTT	CAGAACTACGCGCTGGAGTCT
luciferase	202	CCGGTAAGACCTTTCGGTAC	ACCCCAACATCTTCGACGC
Luciferase-hΔ1	509	AACGCCCTTGAGATGGAAG	ACTGGGACGAAGACGAACAC
hΔ2	519	GGTATACACACTCGTTAGCGTCCAT	AAGCGGGAGACCAAGAACAA
hΔ3	489	CATGTGGGAGAGGAGGTCCTT	CATACATTGCATCAGTGCCAAA
hΔ4	658	GGCAACATTACCTTGTCTTTCA	TTGCTCCAAAACAACAGGTGAT
HPRT	308	GCCATCACATTGTAGCCCTCT	TGCGACCTTGACCATCTTTGG

Antibodies for Western Blot analysis

<i>Name (Provider)</i>	<i>Species</i>	<i>Protein</i>	<i>Molecular weight (kDa)</i>	<i>Dilution</i>
Primary Antibodies				
39N	Rabbit	MR	130 kDa	1:1000 or 1:5000 (tissues)
6G1	Mouse	MR	130 kDa	1:1000 or 1:5000 (tissues)
BRF 1/2 (Cell signaling)	Rabbit	Tis11b	40-50 kDa	1:500 (WB)
Tis11 (TTP) (Sigma)	Rabbit	Tis11	37-45 kDa	1/1000 (WB)
α-Tubulin (Sigma)	Mice	α-Tubulin	50 kDa	1:10000
Secondary Antibodies				
Dylight Anti-Rabbit 800 (H+L)	Goat	Rabbit IgG		1:15000
Dylight Anti-Mouse 680 (H+L)	Rabbit	Mice IgG		1:15000

NB : TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20), Blocking Buffer (Li-Cor)

Antibodies for immunohistochemistry

<i>Name (Provider)</i>	<i>Species</i>	<i>Protein</i>	<i>Dilution</i>
Primary Antibodies			
Tis11b (Dr Schmidlin)	Rabbit	Tis11b	1 :200
6G1 (Dr Gomez-Sanchez)	Mouse	MR	1:120

2. Données supplémentaires et autres éléments de discussion

Dans la première partie de mon travail de thèse, nous avons pu démontrer, pour la première fois, que l'expression du MR est régulée par l'hypertonie *via* des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. Ainsi, nous avons pu associer la fonction déstabilisatrice connue de la protéine Tis11b à ce mécanisme (Baou *et al.* 2009; Ciais *et al.* 2013). Il y a quelques années déjà, des éléments ARE avaient été identifiés dans les régions 3'UTR des récepteurs nucléaires AR et ER (Kenealy *et al.* 2000; Schaaf & Cidlowski 2002). Ces éléments ont été associés à la déstabilisation et au renouvellement des transcrits AR et ER mais aucun mécanisme moléculaire n'avait été précisé. Grâce à ce travail, un nouveau niveau de régulation, s'ajoute aux nombreuses modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles contrôlant l'expression rénale du MR et son activité (Faresse 2014). Ces éléments ouvrent sur de nouvelles interrogations auxquelles nous avons tenté de répondre par les résultats complémentaires présentés dans cette partie.

Existe-il une redondance entre les membres de la famille TIS11 ?

Lors de la caractérisation du mécanisme moléculaire conduisant à cette baisse de l'expression du transcrite et de la protéine MR, nous nous sommes également intéressés aux autres membres de la famille TIS11 : TTP (ou Tis11) et Tis11d. Ces deux autres membres, présentent d'importantes similitudes structurales et fonctionnelles de par la présence de leur double domaine à doigt de zinc (Baou *et al.* 2009). Ces deux facteurs reconnaissent et fixent les transcrits cibles présentant des éléments ARE mais certaines données suggèrent aussi qu'ils ont également la capacité à lier des transcrits cibles, même en l'absence d'ARE (Stoecklin *et al.* 2008). De plus, la présence, dans environ 8% du transcriptome humain, de ces éléments ARE et leur forte conservation au cours de l'évolution des espèces, suggère l'importance de ces mécanismes de dégradation associés aux RBP (base de données ARED) (Bakheet *et al.* 2006). Il est intéressant de noter que malgré d'importantes similitudes, l'inactivation totale chez la souris de l'une de ces trois RBP, ne conduit pas au même phénotype. En effet, les souris KO pour TTP/Tis11 survivent mais elles développent un syndrome cachectique, de l'arthrose et une inflammation généralisée, qui peut être totalement prévenue par des injections d'anticorps anti-TNF (une cible reconnue de TTP) (Taylor *et al.* 1996; Baou *et al.* 2009). Au contraire, les souris KO pour Tis11d et Tis11b ne sont pas viables. Dans le premier cas, les souris meurent deux semaines après la naissance à cause de nombreuses hémorragies (Stumpo *et al.* 2009), et dans le second modèle d'inactivation, les souris meurent *in utero* à E10,5, présentant une fusion

chorioallantoïdienne incomplète, des défauts du développement du tube neural ainsi que des défauts lors de l'angiogenèse (Stumpo *et al.* 2004).

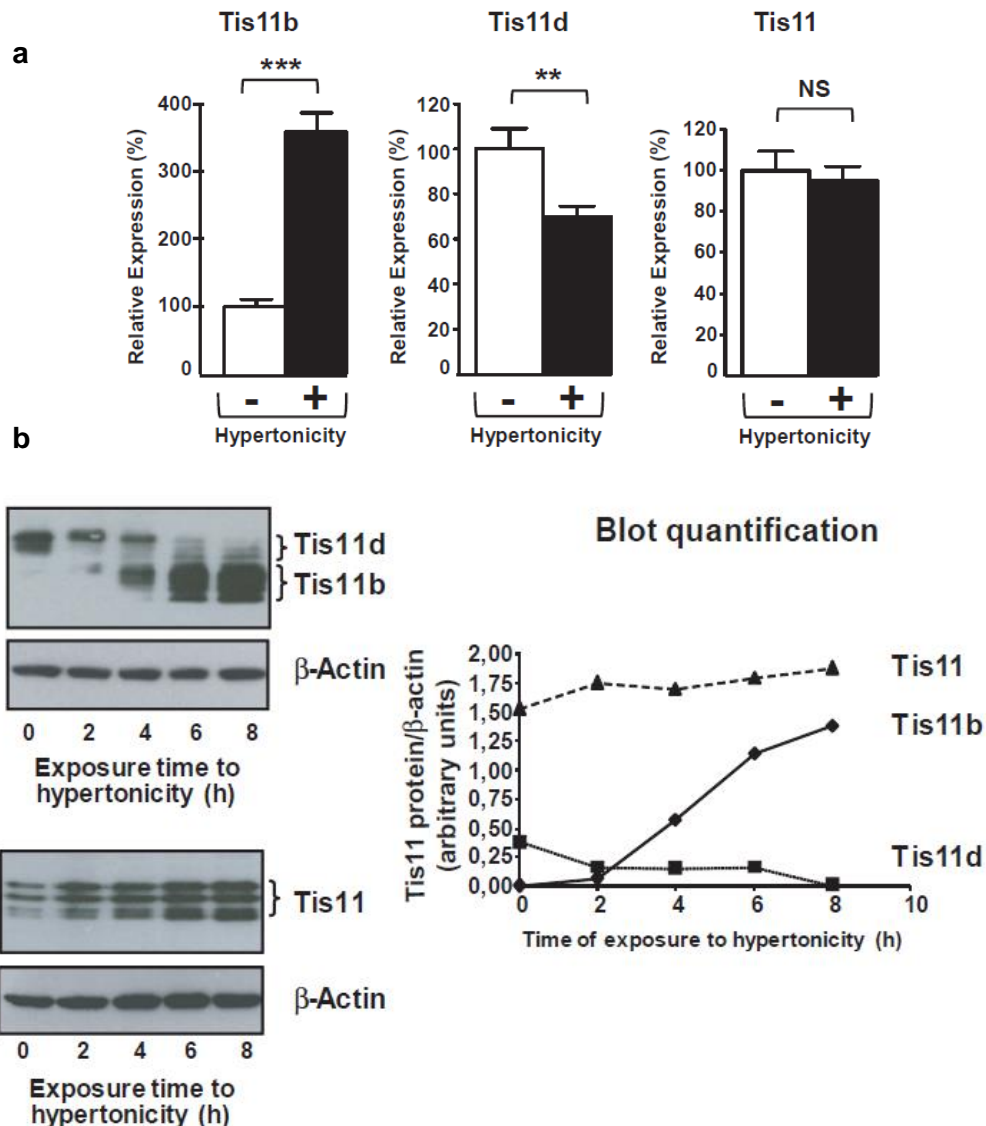


Figure 26 : Analyse de l'expression des membres de la famille TIS11 sous hypertonicité.

(a) Les cellules KC3AC1 ont été exposées ou non à des conditions hypertoniques pendant 6 h. Une extraction des ARN suivie d'une quantification de l'expression des transcrits Tis11, Tis11b et Tis11d par RT-qPCR a été réalisée. (b) Pour l'analyse de l'expression protéique des membres de la famille TIS, les cellules KC3AC1 ont été incubées en présence de 0.2 M raffinose pendant des temps variables allant de 2 à 10 h. Le point 0 correspond aux cellules maintenues en conditions isotoniques. Les résultats présentent la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne de 12 échantillons par condition. Test statistique : Mann Whitney NS : non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ces observations démontrent l'importance de ces protéines au cours du développement et soulignent que les membres de la même famille TIS11 ne sont pas redondants malgré une expression conjointe de ces RBP au sein des mêmes cellules et tissus.

Nous présentons sur la Figure 26 des données supplémentaires, qui montrent que l'hypertonie ne modifie pas de façon significative l'expression de Tis11 dans les cellules KC3AC1 mais diminue significativement celle de Tis11d, à la fois au niveau des transcrits mais aussi au niveau de la protéine. Ces résultats sont à mettre en rapport avec l'augmentation majeure de plus de 300% de l'expression de Tis11b dans les mêmes conditions expérimentales. Comme le montre le Western blot dans la Figure 26b, la protéine Tis11b est identifiée sous la forme de multiples bandes de faible masse moléculaire, correspondant à des formes phosphorylées de la protéine et voit son expression augmenter sous hypertonie. Sur le même blot, en utilisant le même anticorps, la protéine Tis11d a une masse moléculaire supérieure à celle de Tis11b, son expression est progressivement réduite sous hypertonie. Ces résultats indiquent donc que les membres de la famille TIS11 ne sont pas régulés de la même façon par l'hypertonie et suggèrent qu'ils exerceraient donc pas les mêmes fonctions.

L'absence de l'élément TonE dans les régions promotrices des gènes codant Tis11d et Tis11 explique probablement l'absence de stimulation de leur expression par l'hypertonie extracellulaire. La baisse d'expression observée pour Tis11d pourrait être causée par la forte expression de Tis11b qui agirait directement sur son transcrite facilitant sa dégradation. Ce mécanisme pourrait permettre de prévenir une potentielle action de Tis11d sur ses cibles afin d'accélérer ou de maintenir la réduction de la signalisation minéralocorticoïde observée lors de conditions hypertoniques.

La présence de motifs ARE dans les régions 3'UTR de l'ensemble des membres de la famille TIS11, indique que ces protéines TIS11 pourraient s'autoréguler (Brooks *et al.* 2004). Il serait pertinent, dans ce contexte, d'identifier les cibles de Tis11d dans les cellules rénales, car cette protéine pourrait jouer un rôle en condition basale isotonique ou lors d'un stress hypotonique. En effet, il a été démontré que les membres de la famille TIS11, peuvent avoir des cibles communes comme cela a été rapporté dans différentes études (Baou *et al.* 2009). Pour le moment, Tis11d semble jouer un rôle dans la fertilité, puisque cette protéine est fortement exprimée au niveau des ovaires. En effet, la délétion des 29 acides aminés en position N-terminale de Tis11d s'accompagne d'une infertilité chez la souris (Ramos 2012). A noter que son expression a été retrouvée dans de nombreux tissus (poumon, foie, muscle squelettique, rein, pancréas, cœur et cerveau) (Ino *et al.* 1995), ce qui suggère que Tis11d pourrait exercer des fonctions dans ces tissus.

L'hypertonie module-t-elle l'expression du Récepteur Glucocorticoïde?

Le MR et le récepteur glucocorticoïde (GR) sont deux récepteurs nucléaires relativement proches de par leur structure moléculaire, leur mode de fonctionnement, leurs gènes cibles communs ainsi que par leurs ligands (aldostérone et cortisol). Ils sont également exprimés de manière concomitante dans de nombreuses cellules et tissus, suggérant de possibles dialogues croisés ou des fonctions communes (Farman & Rafestin-Oblin 2001).

Afin de déterminer les effets directs de la signalisation glucocorticoïde dans la fonction rénale, Goodwin *et al.* ont réalisé chez la souris, l'inactivation spécifique du GR dans les régions distales du néphron. Les résultats n'ont pas permis de révéler un effet clair de cette invalidation du GR sur les fonctions rénales. Ces souris présentent néanmoins une pression artérielle plus élevée que chez les souris sauvages, suggérant un rôle du GR dans le maintien de la pression artérielle (Goodwin *et al.* 2010). D'autres études ont cependant rapporté un rôle du GR dans la réabsorption de sodium, soulignant que le GR serait capable d'agir de manière coopérative avec le MR pour compenser partiellement la fonction défaillante du MR (Berger *et al.* 1998; Gaeggeler *et al.* 2005). De plus, le GR présente au niveau de sa région 3'UTR des éléments ARE, ces éléments ont par ailleurs été associés au renouvellement du transcrit GR suggérant une régulation post-transcriptionnelle potentielle (Schaaf & Cidlowski 2002). A la lumière de ces différents éléments, une réduction de la fonction et de l'expression du GR pourrait se révéler importante pour réduire significativement les capacités de réabsorption rénale. C'est pourquoi il nous a semblé essentiel d'étudier l'expression du GR lors d'un stress hypertonique dans les cellules KC3AC1.

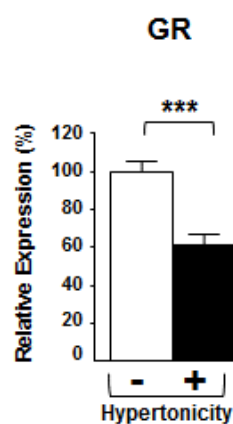


Figure 27 : Expression rénale du transcrit GR lors d'un stress hypertonique.

Les cellules KC3AC1 sont exposées à l'absence (-) ou à la présence (+) de raffinose 0,2 M (condition hypertonique). Après extraction des ARN, une quantification de l'expression du transcrit GR est réalisée par RT-qPCR. Les résultats présentent la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne de 12 échantillons par condition. Test statistique : Mann Whitney NS : non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Les résultats présentés sur la Figure 27 indiquent que l'hypertonie réduit de près de 40% le niveau des transcrits du GR. Ce résultat suggère à l'image du MR, un possible contrôle post-transcriptionnel de l'expression du GR dans les cellules rénales en réponse à une hypertonicité extracellulaire. Il reste à confirmer que cela est également observé sur la protéine GR. La relation entre les membres de la famille TIS11 et la signalisation des récepteurs stéroïdiens, ont été très récemment vérifiées pour le GR et pour d'autres récepteurs stéroïdiens comme AR, PR et ER, qui sont aussi régulés par la protéine TTP/Tis11. Les travaux de Barrios-Garcia *et al.*, ont ainsi mis en évidence un rôle de corépresseur négatif de TTP pour la fonction transcriptionnelle de ces récepteurs dans le cancer du sein, notamment dans les cellules MCF-7 (Barrios-García *et al.* 2016). Ainsi, la protéine TTP pourrait, grâce à ses domaines NLS, assurer des fonctions répressives en prévenant la liaison du récepteur sur ses éléments de réponse, étape essentielle à l'activation de la transcription des gènes cibles (Barrios-García *et al.* 2016). L'expression quasi constante de TTP dans les cellules rénales, indépendamment de la tonicité extracellulaire, pourrait constituer un moyen supplémentaire de réduire l'activité transcriptionnelle du GR dans les conditions basales. Il serait intéressant, dans ce contexte, de déterminer l'existence d'un tel mécanisme de répression dans les cellules rénales KC3AC1 et d'identifier l'acteur responsable de la baisse de l'expression du transcrit GR en condition hypertonique. Il est également intéressant de noter qu'un lien entre GR et TTP a été établi dans les cellules pulmonaires A549 et chez des rats surrénalectomisés. En effet, les travaux de Smoak *et al.*, ont démontré l'induction de l'expression de TTP par les glucocorticoïdes *via* le GR afin de réprimer l'expression de TNF lors d'une inflammation (Smoak & Cidlowski 2006). Ces résultats apportent des arguments solides sur le rôle joué par TTP dans la réponse anti-inflammatoire par les glucocorticoïdes.

L'hypertonie exerce-t-elle un effet direct sur l'expression ou la fonction des gènes cibles du MR?

Nos travaux ont également permis de mettre en évidence l'impact majeur de ces modulations de l'expression rénale du MR sur la signalisation minéralocorticoïde. En effet, en condition hypertonique, l'aldostérone ne stimule plus l'expression précoce des gènes cibles du MR tels que *Gilz* et *Sgk1*. De manière surprenante, l'expression du transcrit *Sgk1* est augmentée en absence d'aldostérone, lorsque les cellules KC3AC1 cultivées sur filtre, sont soumises à une hypertonicité apicale (Figure 28). Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Chen *et al.*, qui avaient rapporté une forte induction de l'expression de *Sgk1* par l'hypertonie dans les cellules rénales IMCD de rat. Ils avaient démontré que cette

augmentation est liée à la présence d'un élément TonE dans la région promotrice du gène *Sgk1* chez le rat. Cette induction de *Sgk1* par l'hypertonie jouerait potentiellement un rôle dans la réponse chez les rongeurs à la déshydratation (Chen *et al.* 2009). Récemment, les travaux de Crambert *et al.*, ont mis en évidence dans les cellules rénales de l'OMCD chez la souris et sur les modèles cellulaires mCCD_{cl1} et mpkCCD₁₄, un mécanisme de dégradation du canal ENaC en réponse à une hypertonicité extracellulaire (Crambert *et al.* 2014). Ce mécanisme nommé UPR pour « Unfolded Protein Response » permet lors d'un stress cellulaire d'inhiber la machinerie traductionnelle après détection d'une accumulation de protéines anormales au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et d'accélérer leur dégradation. Dans un premier temps, est initiée la synthèse des protéines chaperonnes et des protéines composant le système de dégradation ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation). Cette étape est suivie par la répression rapide de la synthèse protéique limitant ainsi l'arrivée de nouvelles protéines au RE et sa surcharge. Ce système permet à la cellule de s'adapter aux changements environnementaux mais peut conduire au déclenchement de processus apoptotiques lorsque la cellule ne recouvre pas son homéostasie (Rutkowski & Kaufman 2004; Ron & Walter 2007). Dans leur étude, les auteurs ont démontré que cette réponse spécifique se met en place pour réduire la réabsorption sodée sans pour autant empêcher celle de l'eau lors d'une déshydratation chez la souris au niveau de l'OMCD. Cette étude souligne la complexité des mécanismes mis en place dans les régions distales du néphron pour permettre une réponse adaptée de l'organisme (Crambert *et al.* 2014). Dans ce cadre, nos résultats démontrant que l'expression rénale de MR est réduite vont dans le même sens d'une réduction de la réabsorption sodée.

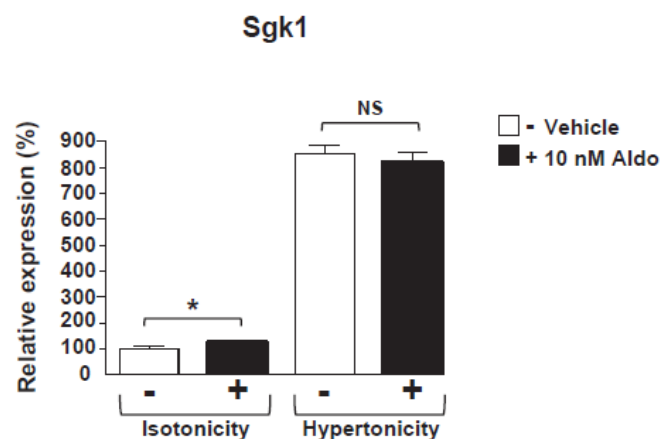


Figure 28 : L'hypertonie modifie la réponse à l'aldostérone des cellules rénales.

Les cellules KC3AC1 sont cultivées sur filtre et sont soit conservées en milieu isotonique soit exposées à l'hypertonie pendant 6 h. Elles sont ensuite soumises ou non à l'action de l'aldostérone (10 nM) durant 1 h. Après extraction des ARN, la quantification de l'expression de *Sgk1* est réalisée par RT-qPCR. Les résultats présentent la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne de 12 échantillons par condition. Test statistique : Mann Whitney NS : non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Pertinence physiopathologique de ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle ?

Les mécanismes post-transcriptionnels mis à jour par nos travaux démontrent la conservation, entre l'homme et la souris, des motifs critiques ARE₃ et ARE₄ pour l'action déstabilisatrice de Tis11b, ainsi que l'existence d'une corrélation négative entre les expressions de Tis11b et du MR dans le rein de souris soumises à un challenge osmotique (restriction hydrique, action de diurétiques, ou régime riche en sodium). Ces résultats soulignent la pertinence de ces mécanismes post-transcriptionnels mis en jeu dans un contexte de fonction rénale et du maintien de l'homéostasie hydro-électrolytique. Ce phénomène pourrait être particulièrement relevant dans le cas de pathologies affectant le gradient corticopillaire telles que les syndromes de Bartter ou de Gitelman.

Il serait intéressant, de réaliser une analyse plus détaillée de la localisation rénale de Tis11b par microdissection de tubules afin d'établir si ces mécanismes peuvent être généralisés ou pas à l'ensemble du néphron distal. De plus, la protéine Tis11b est aussi exprimée dans le foie, les poumons, le pancréas, le cœur, les reins et de manière plus faible dans le muscle squelettique, le colon, le thymus, la rate, l'intestin grêle ou bien encore le cerveau (Shimada *et al.* 2000). Cette expression, étendue à de très nombreux tissus, suggère un nombre de cibles variées, une fonction primordiale dans l'organisme et sa possible implication dans le contrôle de l'expression du MR dans ses multiples tissus cibles (Viengchareun *et al.* 2007). De plus, Tis11b pourrait jouer un rôle dans la baisse physiologique de l'expression rénale du MR, observée à la naissance chez les nouveau-nés et responsable d'une résistance aux minéralocorticoïdes (Martinerie *et al.* 2009a, b). En effet, nos précédents travaux ont démontré la réduction drastique de l'expression rénale du MR en période périnatale et ce malgré des taux importants de aldostérone circulants. Cette insensibilité physiologique à l'aldostérone à la naissance rappelle le tableau clinique du PHA I. Dans ce contexte, l'analyse de l'expression de cette RBP au cours de l'ontogenèse rénale pourrait répondre en partie à cette hypothèse et permettre d'établir de nouvelles stratégies modulant notamment l'expression de Tis11b.

2^{ème} Partie :

Rôle de la protéine HuR dans l'augmentation de l'expression du MR en réponse à l'hypotonie et dans l'édition de variants de splicing du MR

1. Justification du projet

1.1. Contexte de l'étude :

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, l'expression du MR varie le long du néphron (Doucet & Katz 1981; Lombès *et al.* 1990b). Les différents segments néphroniques sont soumis à des fluctuations extrêmes de la tonicité générées par les mécanismes de concentration et de dilution des urines au niveau de laanse de Henlé (Dantzler *et al.* 2014). Toujours dans l'objectif de répondre à l'hypothèse, selon laquelle les variations de tonicité extracellulaire, pourraient moduler l'expression du MR le long des tubules, l'équipe s'est appuyée là encore sur le modèle KC3AC1 afin de déterminer les effets d'une baisse de la tonicité extracellulaire ou hypotonicité.

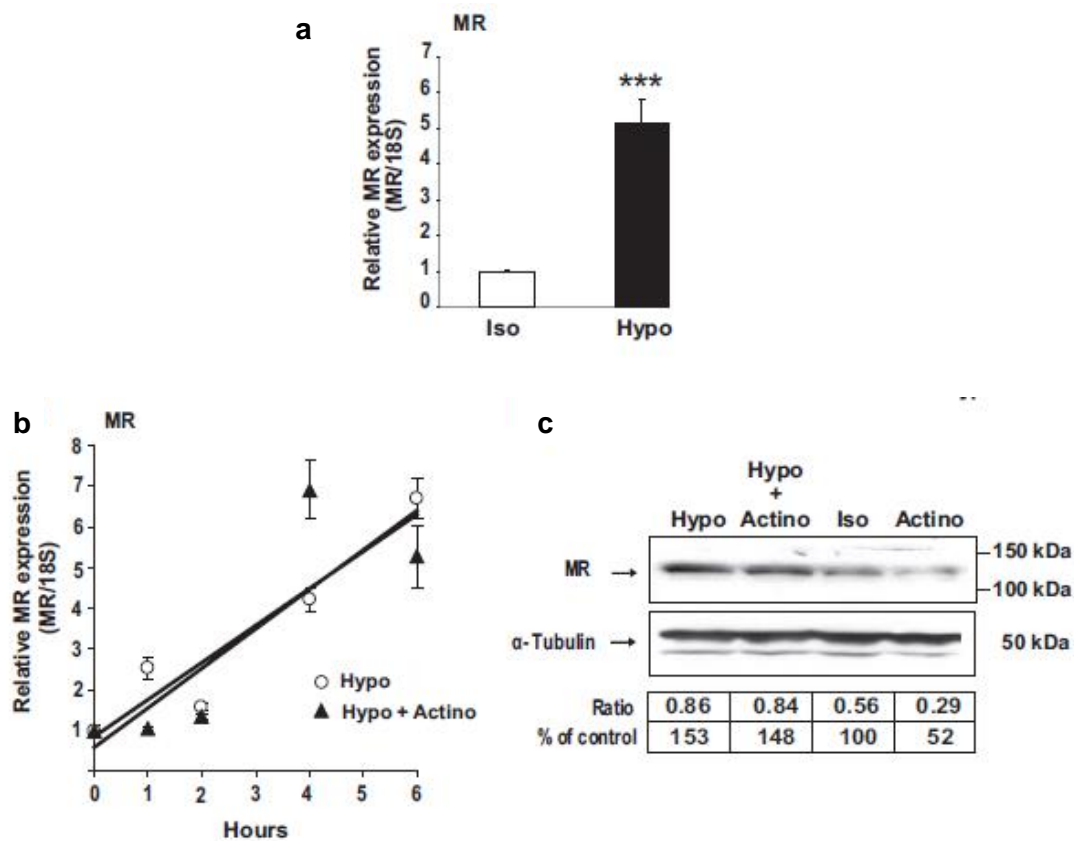


Figure 29 : L'hypotonicité augmente l'expression du MR via des mécanismes post-transcriptionnels. (a) Les cellules KC3AC1 sont exposées pendant 6 h à un milieu hypotonique (Hypo) ou isotonique (Iso), les ARN sont ensuite extraits et l'expression des transcrits MR est mesurée par RT-qPCR. (b, c) Les cellules KC3AC1 sont incubées dans un milieu hypotonique durant une cinétique (0 h à 6 h), elles sont également soumises ou non à l'action de l'actinomycine D. L'analyse des transcrits MR par RT-qPCR (b) et de la protéine MR par Western Blot (c) ont été réalisées. (D'après Viengchareun *et al.* 2009)

De manière opposée aux effets de l'hypertonie sur l'expression du MR, lorsque les cellules KC3AC1 sont soumises à une hypotonie extracellulaire, l'expression du transcrite et de la protéine MR augmente significativement (Figure 29). Les effets de l'hypotonie sur l'expression du MR sont maintenus en présence d'inhibiteurs de la transcription (actinomycine D) démontrant que des mécanismes post-transcriptionnels sont responsables de cette augmentation (Figure 29) (Viengchareun *et al.* 2009).

1.2. Hypothèses de travail :

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons cherché à disséquer les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation de l'expression rénale du MR en réponse à une hypotonie extracellulaire.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la protéine stabilisatrice de transcrits HuR (Hinman *et al.* 2008), une protéine de liaison à l'ARN, qui est capable d'interagir avec la région 3'UTR de ses transcrits cibles afin de prolonger leur demi-vie et d'augmenter ainsi leur niveau d'expression (Pascale & Govoni 2012). De façon intéressante, plusieurs études ont aussi rapporté que la protéine HuR est capable de réguler l'épissage alternatif des transcrits par des mécanismes de saut d'exons ou par l'utilisation d'exons terminaux alternatifs (Chang *et al.* 2014; Dutertre *et al.* 2014; Lu *et al.* 2014).

Dans ce contexte, la protéine HuR nous a semblé être une candidate de choix pour plusieurs raisons :

- C'est la principale protéine de liaison à l'ARN capable d'augmenter la stabilité d'un transcrite cible.
- Nous avons identifié une cinquantaine d'éléments ARE dans la région 3'UTR du transcrite MR (Viengchareun *et al.* 2009).
- Plusieurs études ont décrit l'existence de variants d'épissage du transcrite MR (Zhou *et al.* 2000; Zennaro *et al.* 2001).

1.3. Objectifs du travail :

La seconde partie de mon travail de thèse avait donc pour objectifs de :

- ✓ Préciser l'implication de HuR dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR en réponse à une hypotonie extracellulaire
- ✓ Identifier les motifs essentiels à l'action stabilisatrice de HuR

- ✓ Mesurer l'impact de l'augmentation de l'expression du MR sur la signalisation minéralocorticoïde
- ✓ Clarifier le rôle de HuR dans l'édition d'un nouveau variant de transcrit MR
- ✓ Evaluer la relevance physiopathologique de l'action de HuR sur la fonction rénale.

L'article 2 présente les résultats de la seconde partie de ma thèse. Dans cette étude, nous avons clairement identifié la protéine HuR comme étant le facteur principal de l'augmentation de l'expression du MR dans les cellules KC3AC1 en réponse à une hypotonicité extracellulaire. Nous avons également identifié un nouveau variant de splicing du MR généré par la protéine HuR nucléaire. Finalement, nous avons montré que le variant $\Delta 6$ MR se comporte comme un transactivateur ligand-indépendant, qui exerce un effet dominant négatif sur la protéine MR sauvage. Ce travail a été soumis pour publication.

Article 2

RNA Binding Protein HuR Splices and Stabilizes Mineralocorticoid Receptor Transcript Under Hypotonicity Enhancing Renal Mineralocorticoid Signaling

Ingrid Lema, Larbi Amazit, Khadija Lamribet, Anne Blanchard,

Marc Lombès*, Nadia Cherradi*, Say Viengchareun*

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente.

Manuscrit soumis

RNA-Binding Protein HuR Splices and Stabilizes Mineralocorticoid Receptor Transcript Under Hypotonicity, Enhancing Renal Mineralocorticoid Signaling

Ingrid Lema¹, Larbi Amazit^{1,2}, Khadija Lamribet¹, Jérôme Fagart¹, Anne Blanchard³,

Marc Lombès^{1,4¶}, Nadia Cherradi^{5,6,7¶}, Say Viengchareun^{1¶}.

¶ Senior authors who equally contributed to this work

¹ Inserm U1185, Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, F-94276, Le Kremlin-Bicêtre, France;

² UMS 32, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France;

³ Inserm, Centre d'Investigations Cliniques 9201, F-75015 Paris, France;

⁴ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital de Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Le Kremlin Bicêtre F-94275, France;

⁵ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm U1036, Grenoble, France, F-38000

⁶ Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Grenoble, F- 38000, France;

⁷ Université Grenoble Alpes, Unité Mixte de Recherche-S1036, Grenoble, F-38000, France.

Correspondence should be addressed to:

Marc Lombès, MD, PhD or Say Viengchareun, PhD

Inserm U1185, Faculté de Médecine Paris-Sud

63 rue Gabriel Peri, F-94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

E-mail: marc.lombes@u-psud.fr or say.viengchareun@u-psud.fr

Phone: 33 1 49 59 67 02

Fax: 33 1 49 59 67 32

Or

Nadia Cherradi, PhD

INSERM U1036, BCI

Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, CEA Grenoble

17, rue des Martyrs

38054 Grenoble Cedex 09, France

Phone: 33 4 38 78 35 01

Fax: 33 4 38 78 50 58

E-mail: nadia.cherradi@cea.fr

Beside transcription, posttranscriptional control of gene expression represents another pivotal level of regulation, modulating levels of key proteins requiring rapid adjustment in response to extracellular modifications. Posttranscriptional control mechanisms generally involve RNA-binding proteins or microRNA affecting transcript stability and/or translation efficiency. We report here that hypotonicity leads to rapid export of the RNA-binding protein HuR to the cytoplasm of renal cells, where it binds the 3'-untranslated region of mineralocorticoid receptor (MR) transcript, thereby increasing its stability. We also identify a new MR splice variant, $\Delta 6$ MR, generated by a HuR-dependent exon skipping event. Expression of $\Delta 6$ MR is regulated by tonicity. This variant has a dominant-negative effect on the transcriptional activity of full-length MR protein. Our data shed new light on the dual role of HuR as a master regulator of MR expression and a stabilizing factor for MR transcript under hypotonicity, leading to the enhancement of renal MR signaling.

Introduction

In the distal nephron, Na⁺ reabsorption is tightly regulated by aldosterone, a steroid hormone that activates the mineralocorticoid receptor¹ (MR, *NR3C2*). MR acts as a transcription factor, stimulating expression of ionic transporters, such as the α subunit of the epithelial Na⁺ channel (α ENaC, *SCNN1A*), the α 1 subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase (*ATP1A1*), and other target genes, such as serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (*SGK1*), which is involved in transepithelial Na⁺ reabsorption²⁻⁴.

There is growing evidence to suggest that modulation of MR expression greatly affects renal function. Indeed, overactivation of the mineralocorticoid pathway leads to marked Na⁺ retention, hypervolemia, high blood pressure and subsequent organ damage^{5,6}. Conversely, abnormally low levels of MR signaling at birth lead to partial aldosterone resistance in human newborns reminiscent of the MR haploinsufficiency observed in autosomal dominant pseudohypoaldosteronism^{7,8}. These observations highlight the importance of MR levels, but the molecular mechanisms governing these levels remain unclear. MR expression is controlled at various levels. We have already identified two alternative promoters controlling transcription of the *NR3C2* gene, giving rise to two MR transcript isoforms^{9,10}. We and others have also demonstrated that MR protein levels and activity may be regulated posttranslationally, through alternative translational initiation¹¹ together with sumoylation¹², phosphorylation¹³ and ubiquitination processes¹⁴.

In the nephron, MR levels are highest in the cortex, in which the tubular lumen is hypotonic (50 mOsm kg⁻¹), and lowest in the medulla¹⁵, which is hypertonic (1200 mOsm kg⁻¹). Based on these observations, we investigated whether and how MR expression could be modulated by variations in extracellular fluid tonicity generated by the corticopapillary gradient¹⁶. Using both differentiated renal KC3AC1 cells and mouse models, we demonstrated that hypertonicity greatly decreased renal MR levels, whereas MR transcript and protein levels increased under conditions of hypotonicity¹⁷. We recently elucidated a novel posttranscriptional mechanism based on the recruitment of RNA-binding proteins (RBP) interacting with the 3'-untranslated region (3'-UTR) of MR transcript that modulates mRNA turnover in response to osmotic stress¹⁸. We showed that hypertonicity strongly

induces expression of the RBP Tis11b (Tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11b), leading to MR transcript degradation, blunted responses to aldosterone stimulation and impaired MR signaling¹⁹.

In this study, we decipher the posttranscriptional events underlying hypotonicity-induced MR expression and identify HuR (Hu antigen R) as another RBP from the Hu family (also including Hu B, Hu C and Hu D). HuR, originally described as ELAV1 (embryonic lethal, abnormal vision, *Drosophila* homolog-like 1), is encoded by the *ELAV1* gene in humans. HuR regulates short-lived mRNAs, in an adaptive response to various stress stimuli, such as hypoxia, ATP depletion and oxidative stress, by stabilizing target transcripts^{20,21}. The HuR protein has been described as a master regulator of cell survival and proliferation²², because its knockdown is lethal in mice²³, highlighting its fundamental role in mRNA regulatory processes. HuR was subsequently characterized as an important regulator of alternative splicing, either directly, by promoting exon skipping, or indirectly, by modulating the expression of other splicing factors^{24,25,26}. Several MR splice variants have already been reported^{27–30}. We therefore hypothesized that HuR might also play a determinant role in processing the MR pre-mRNA.

We find that HuR regulated MR levels *via* at least two posttranscriptional levels. First, HuR is rapidly exported to the cytoplasm under hypotonicity, where it interacts with the MR 3'-UTR to stabilize and increase MR levels, thereby enhancing MR signaling. Second, we identify a $\Delta 6$ MR splice variant, resulting from a HuR-dependent alternative splicing event, lacking exon 6. A frameshift of the open reading frame of this variant leads to a premature stop codon and the generation of an 86-kDa MR protein lacking the ligand-binding domain. This $\Delta 6$ MR isoform is expressed in all murine MR-expressing tissues and cells, including renal KC3AC1 cells, and behaves as a ligand-independent transactivator, with dominant-negative effects on the full-length (FL) MR protein. Hypotonicity decreases the relative levels of $\Delta 6$ MR and increases FL MR expression, promoting aldosterone sensitivity and, presumably, Na⁺ reabsorption in renal cells.

Overall, this study reveals a novel regulatory mechanism by which rapid HuR shuttling facilitates adaptive responses to osmotic stress in renal cells. This posttranscriptional control constitutes the

first demonstration linking stabilization and processing of a nuclear receptor mRNA with major potential pathophysiological consequences, particularly in a context of aldosterone-related kidney disease, hypertension or mineralocorticoid resistance.

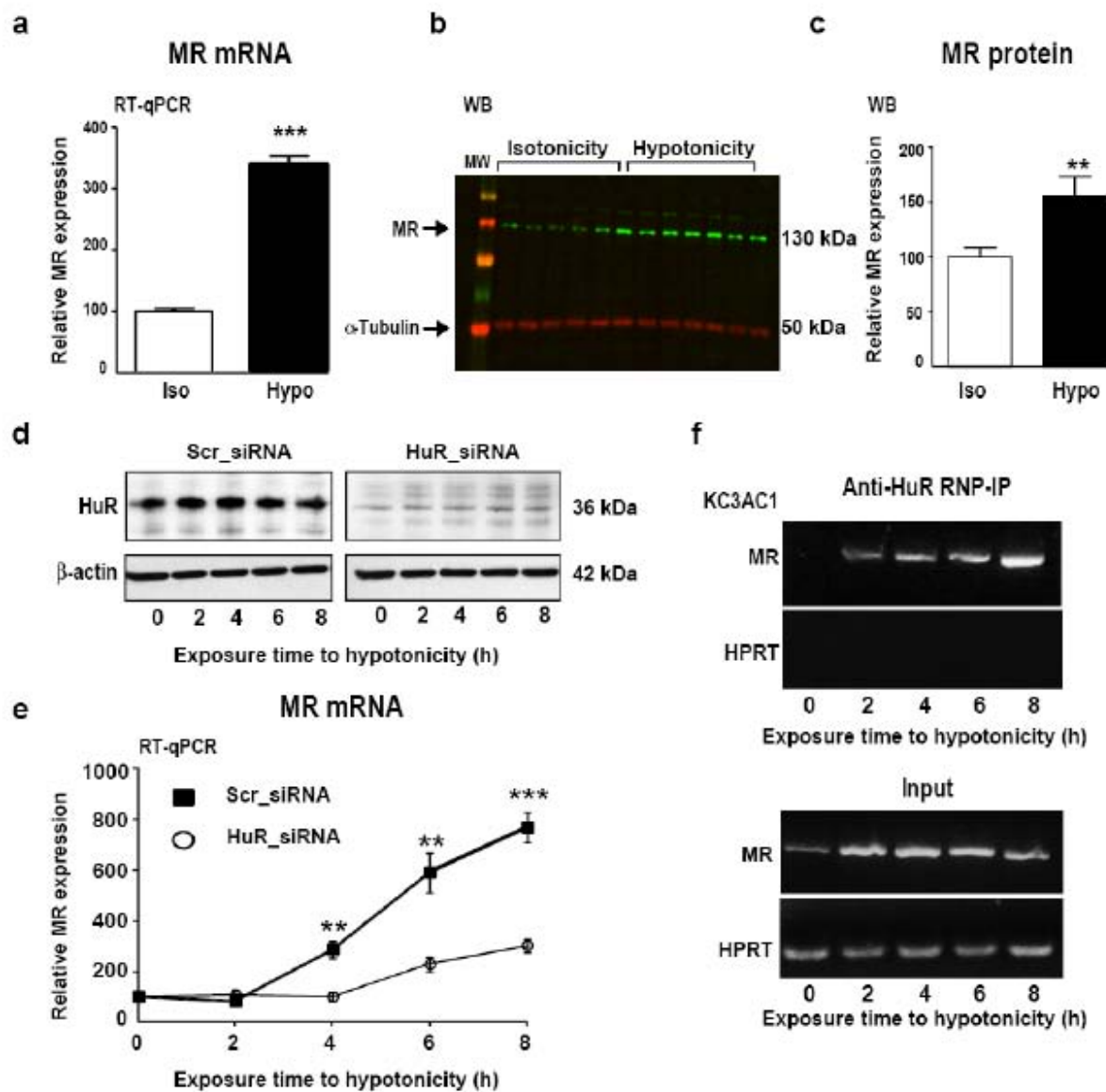


Figure 1. HuR mediates the hypotonicity-induced increase in MR expression in renal cells. (a-c) KC3AC1 cells were cultured under conditions of isotonicity (Iso, 300 mOsmol l⁻¹) or hypotonicity (Hypo, 150 mOsmol l⁻¹) for 6 h for RT-qPCR (a) or 18 h for WB (b, c). Transcript and protein levels were normalized relative to 18S rRNA and α -tubulin, respectively, and are expressed as a percentage of MR mRNA or MR protein levels in cells exposed to Iso conditions. RT-qPCR data are expressed as the mean \pm SEM of three independent experiments ($n=30-32$) and WB data are presented as the mean \pm SEM of three independent experiments ($n=6$). **, ***, significantly different from isotonicity, with $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively (Mann-Whitney U-test). (d-e) The silencing of HuR expression prevented the hypotonicity-induced increase in endogenous MR transcript levels in renal cells. KC3AC1 cells were transfected with scrambled (Scr) or HuR siRNAs for 48 h and exposed to hypotonicity conditions for various periods of time. HuR protein and β -actin (loading control) levels were determined by WB (d). Endogenous MR mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized relative to 18S rRNA levels (e). The data shown are the means \pm SEM of three independent experiments ($n=6$). **, ***, significantly different from HuR_siRNA treatment, with $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively (Mann-Whitney U-test). (f) Hypotonicity induces the interaction of HuR with the endogenous MR mRNA. KC3AC1 cells were exposed to hypotonic conditions (0 to 8 h) and RNP-IP was then performed. The upper panel shows RNP-IP complexes of HuR and MR mRNA, formed in response to hypotonicity. The lower panel (Input) shows amplification of the MR and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) transcripts in 10% non-immunoprecipitated lysates. Note the absence of HPRT mRNA in the immunoprecipitates, indicating that the interaction between MR mRNA and HuR was specific. One experiment representative of the three independent experiments carried out is shown.

Results

The RBP HuR mediates the hypotonicity-induced increase in MR expression

We recently showed that hypertonicity (500 mOsmol l⁻¹) decreases renal MR levels in both KC3AC1 cells and mice, by inducing Tis11b expression¹⁹. Conversely, hypotonicity increased MR expression *via* a transcription-independent event¹⁷. Indeed, MR mRNA levels decreased when KC3AC1 cells were incubated under isotonic conditions (300 mOsmol l⁻¹) in the presence of DRB, a transcription inhibitor. Hypotonic conditions (150 mOsmol l⁻¹) led to a four-fold increase in MR mRNA levels, regardless of the presence or absence of DRB (Supplementary Fig. 1), suggesting that hypotonicity induced MR expression through a mechanism involving an increase in mRNA stability. Hypotonicity significantly increased MR transcript and protein levels (Fig. 1a to c). An increase in MR expression was also observed with synthetic hypotonic media, indicating that the increase in MR abundance was due entirely to a decrease in extracellular osmolarity, rather than other mechanisms, such as energy depletion (Supplementary Fig. 2). We then investigated whether this increase in MR levels was dependent on HuR in KC3AC1 cells. These cells were treated with a specific siRNA to knockdown endogenous HuR levels (HuR siRNA) or with a nonspecific control siRNA (Scrambled Scr_siRNA), and levels of HuR expression were assessed by western blotting (Fig. 1d). Consistent with the role of HuR in the stabilization of its mRNA targets, HuR depletion significantly prevented hypotonicity-induced increase in MR steady-state levels (Fig. 1e). As HuR regulates its mRNA targets by interacting with their 3'-UTR, we assessed possible interactions between HuR and the MR mRNA in KC3AC1 cells. Ribonucleoprotein Immunoprecipitation (RNP-IP), followed by reverse transcription-PCR, showed that endogenous HuR and the MR transcript formed a ribonucleoprotein complex (Fig. 1f). However, this interaction occurred only under conditions of hypotonic stress, demonstrating the involvement of HuR in MR transcript induction under hypotonic conditions.

The nuclear export of HuR is rapidly induced by hypotonicity and reversible

HuR shuttles between the nucleus and the cytoplasm to modulate mRNA turnover in response to various stimuli, such as cellular stress or mitogens³¹⁻³³. We therefore investigated HuR trafficking in

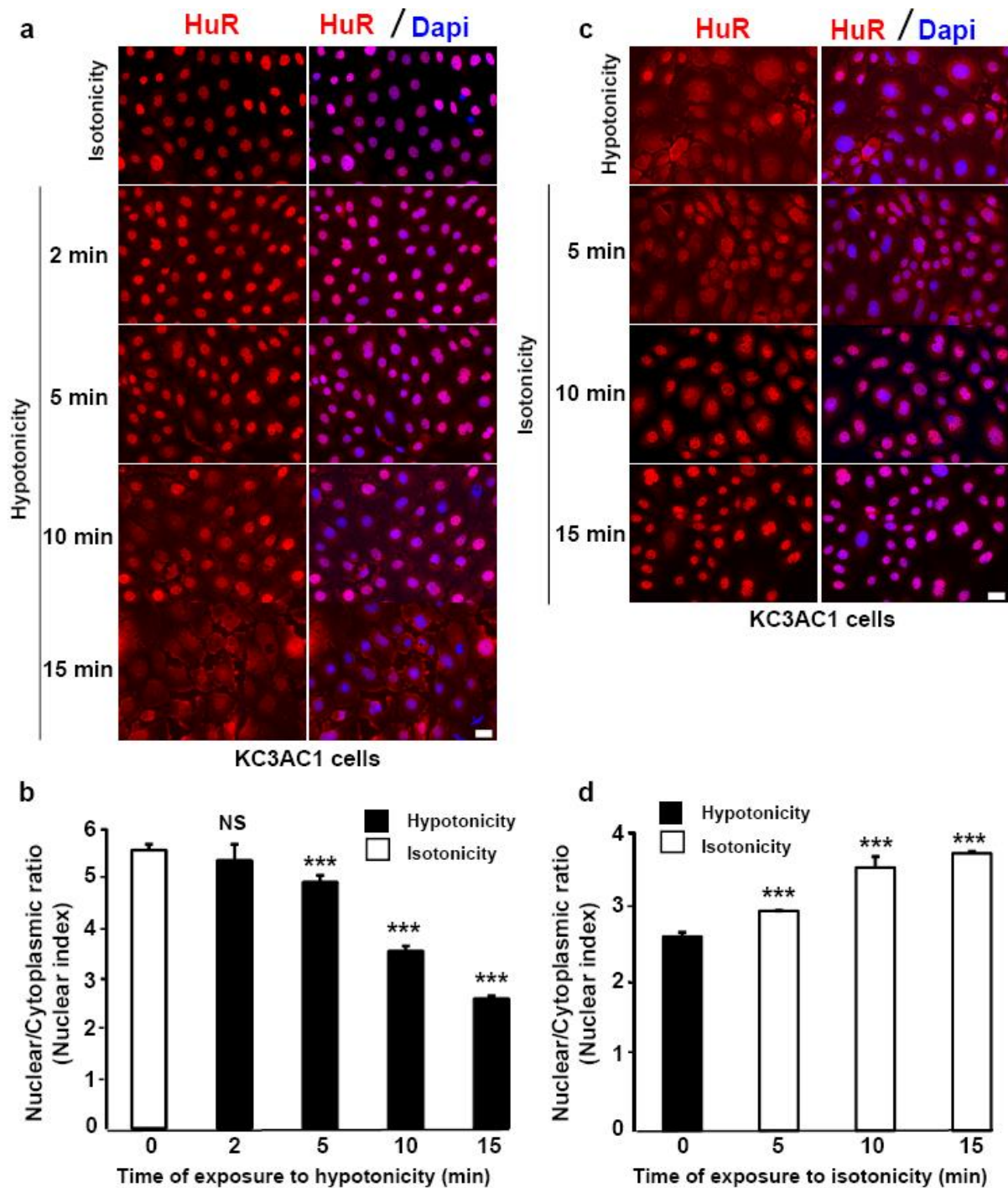


Figure 2. The nuclear export of HuR is rapidly induced by hypotonicity and reversible (a-b) KC3AC1 cells were cultured under isotonic conditions (Isotonicity) and were then incubated under hypotonic medium (Hypotonicity) for the times indicated. The cells were then fixed and analyzed by immunocytochemistry with an Alexa Fluor 555-coupled mouse anti-HuR antibody (Bar, 25 μ m). The nuclei were stained with DAPI (a). The pattern of HuR subcellular localization was determined with quantification by high-throughput microscopy, as described in the methods section. The results are presented as the ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence (b). ***, $P < 0.001$, $n > 5000$ cells for each set of conditions (Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc tests for multiple comparisons). (c-d) KC3AC1 cells were cultured for 15 min in hypotonic medium (Hypotonicity, black) and then were return to isotonic medium (Isotonicity, white) for the times indicated. Cells were analyzed by immunocytochemistry (c) and the subcellular distribution of HuR was analyzed by HTM quantification (d), as described in (b).

response to hypotonicity in KC3AC1 cells. Immunocytochemistry showed that hypotonicity induced a clear relocalization of HuR to the cytoplasm (Fig. 2a). Quantification with automated high-throughput microscopy (HTM) made it possible to calculate the nuclear/cytoplasmic ratio (N/C ratio), as previously described³⁴. Exposure to hypotonic conditions led to a robust decrease in N/C ratio, consistent with the rapid export of HuR to the cytoplasm, within as little as 5 min (Fig. 2b). This export of nuclear HuR was not observed in primary cultures of human fibroblasts, consistent with a renal cell-specific effect (Supplementary Fig. 3). As expected, hypotonicity also induced a rapid swelling of the cell, as demonstrated by the 29% increase in renal cell surface area calculated by HTM (from $1,186 \pm 12 \mu\text{m}^2$, $n=900$, under isotonic conditions to $1,530 \pm 16 \mu\text{m}^2$, $n=1650$, after 15 min of exposure to hypotonicity, $*P<0.001$), corresponding to an increase in cell volume of approximately 46%. The export of HuR from the nucleus was rapidly reversible, as the amount of HuR labeling in the cytoplasm decreased whereas that in the nucleus gradually increased when KC3AC1 cells were returned to isotonic conditions (Fig. 2c). This effect was accompanied by a significant increase in N/C ratio (Fig. 2d).

HuR increases MR 3'-UTR-driven luciferase activity

HuR has been shown to interact with various RNA motifs consisting of $^{\text{U}}_{\text{A}}\text{UUUA}$ (AU-rich sequences) pentamers or U-rich stretches^{24,25,35}. It has also been suggested that hairpin RNA secondary structures contribute to the specificity of HuR binding³⁵. We identified more than 50 AU-rich or U-rich motifs along the length of the ~2.8 kb of the MR 3'-UTR (Fig. 3 and Supplementary Table 1). We identified binding sites for HuR on MR transcript, using plasmid constructs previously generated in our laboratory¹⁹ and originally referred to as h Δ 1, h Δ 2, h Δ 3 and h Δ 4, in which the human MR 3'-UTR or its truncated regions R1, R2, R3 and R4 were inserted downstream from the luciferase reporter gene (Fig. 3). KC3AC1 cells were cotransfected with these luciferase reporter plasmids and HuR expression vector. In the presence of HuR, a significant 1.5-fold increase in luciferase activity was observed with the FL MR 3'-UTR and with R3 truncated region, whereas no significant change in luciferase activity was detected with the R1, R2 and R4 constructs (Fig. 3). The R3 region is, thus,

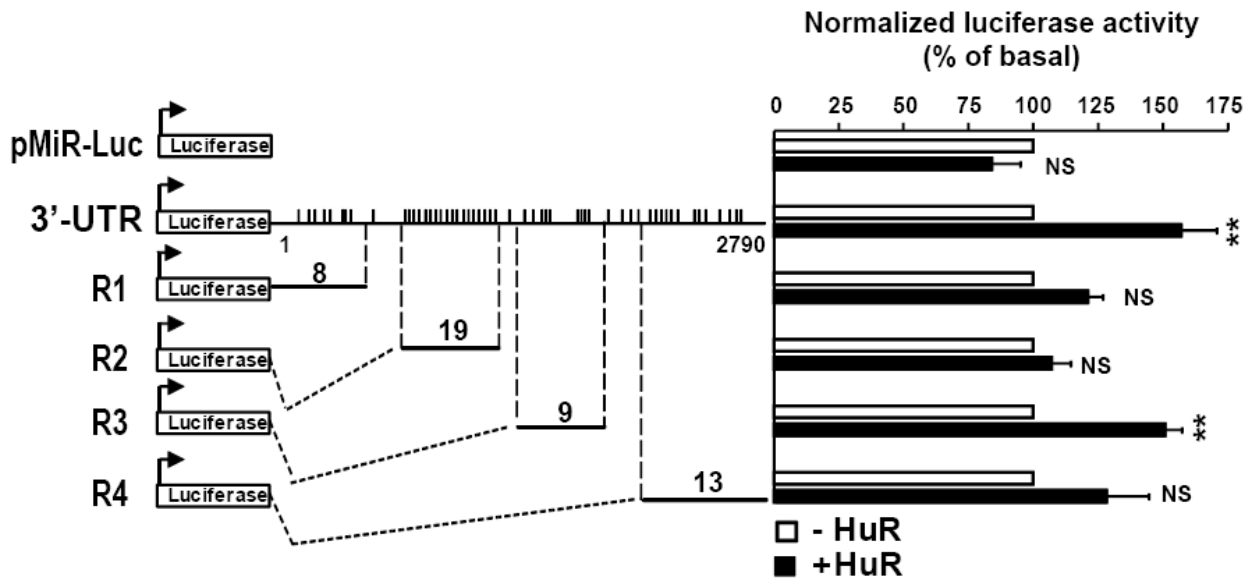


Figure 3. HuR increases MR-3'-UTR driven luciferase activity through a specific U-rich sequence. Full length or truncated human MR (hMR)-3'UTR sequences were inserted into pMiR-Report vector, downstream from the luciferase reporter gene, as previously described¹⁹. The left panel shows a schematic representation of the luciferase (Luc) reporter gene fused to the entire hMR 3'-UTR or to the truncated regions R1 to R4 of the hMR-3'-UTR. The number of U-rich motifs (vertical bars) is indicated for each mutant. HEK 293T cells were transiently transfected, as described in the methods section. The luciferase activities of each construct were measured in the absence (white) or presence (black) of pTarget-HuR plasmid (right panel). The values show are the means \pm SEM of 3 independent experiments ($n=6$). ** $P<0.01$, significantly different from the luciferase activity of the corresponding vector in the absence of HuR, arbitrarily set at 100% (one-way analysis of variance and Dunnett post hoc tests).

essential for stabilizing function of HuR. We then used mFold prediction software to determine whether this region harbored RNA secondary structures³⁶. A highly conserved hairpin motif, similar to those described for the *PTMA* and *MTA1* genes^{35,37}, was identified in the R3 region of the MR 3'-UTR (Supplementary Fig. 4). We investigated the role of this hairpin motif in the binding of HuR to the R3 region, by mutating the uridine (U) at position +1651 (+1 relative to the stop codon TGA) to cytosine (C). This U-to-C substitution totally abolished this RNA secondary structure (Fig. 4a, mutR3). RNP-IP assays in KC3AC1 cells showed that HuR interacted strongly with MR 3'-UTR and with the R3 region. (Fig. 4b). By contrast, only weak binding of HuR to the R1 and R2 regions was detected and no specific signal was obtained with R4. We also conducted reporter gene assays with the same plasmid constructs. The U-to-C substitution completely disrupted the R3/HuR complexes (Fig. 4b) and abolished R3-driven luciferase activity (Fig. 4c), demonstrating the requirement of this hairpin motif for binding and stabilizing functions of HuR. Many other studies have reported competition between RBP for binding to the same target transcripts and their corresponding motifs^{38,39}. We assessed the potential antagonism between HuR and Tis11b for the regulation of MR transcript turnover, by subcloning the R2-3 region, which harbors both the key ARE₃ and ARE₄ motifs of the R2 region responsible for the destabilizing effect of Tis11b¹⁹ and the hairpin motif located in the R3 region, which is required for the stabilizing effect of HuR (Fig. 4d). Exposure to hypotonic stress for 2 h induced a significant 1.6-fold increase in luciferase activity, whereas, as expected, hypertonic stress decreased the luciferase activity encoded by the R2-3 construct (Fig. 4e). When KC3AC1 cells were exposed successively to hypotonicity and then to hypertonicity, a large decrease in luciferase activity was still observed, suggesting that the protection of the MR transcript by HuR may be reduced by the destabilizing action of hypertonicity-induced Tis11b. These results indicate that HuR binding to the MR 3'-UTR does not impair subsequent Tis11b binding and that MR mRNA steady-state levels are regulated through the balance between antagonistic actions of HuR and Tis11b in response to osmotic stress.

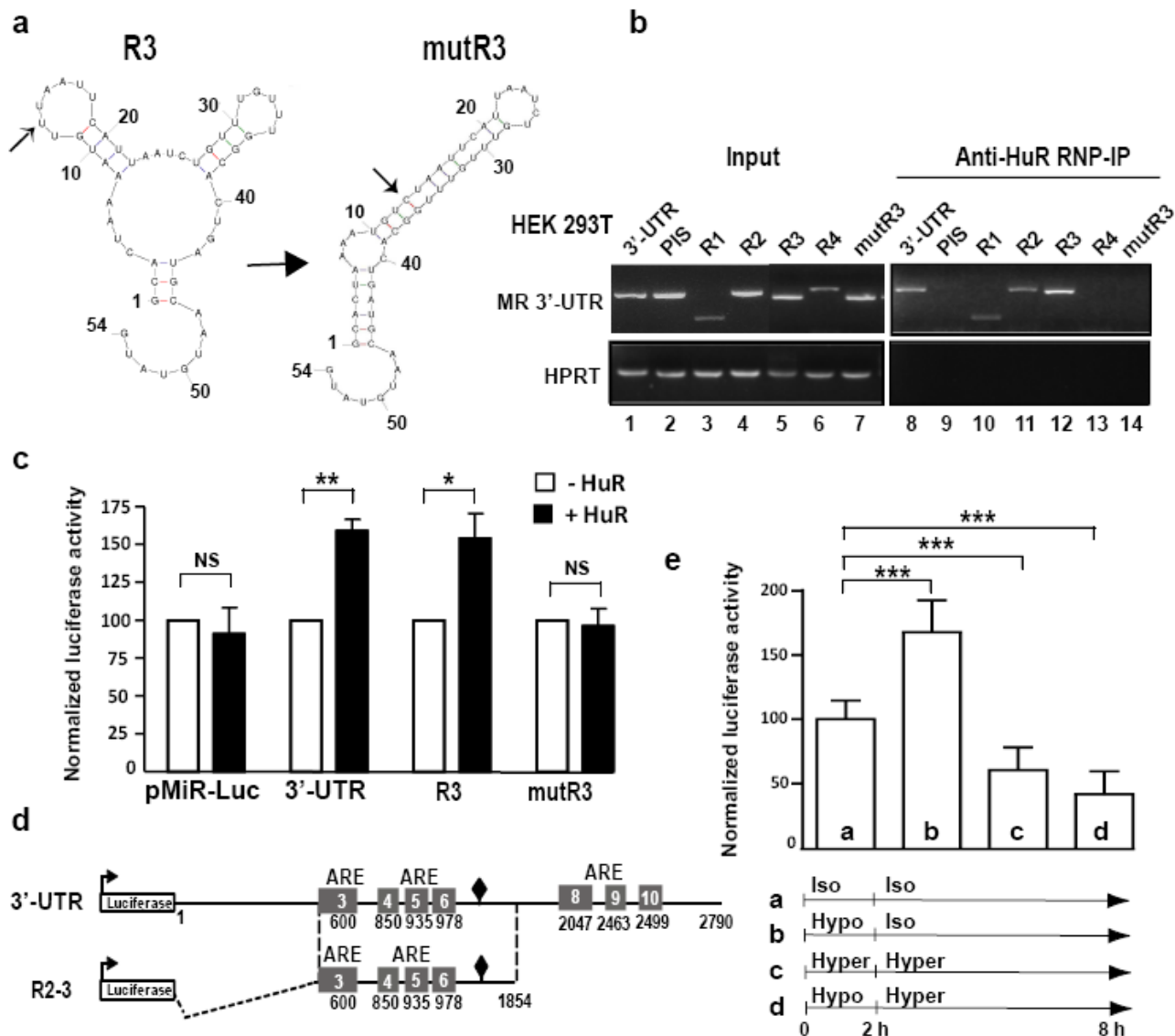


Figure 4. HuR preferentially binds to a central U-rich region (R3) within the MR 3'-UTR. (a) Left panel: model generated with the mFold web server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) for the secondary structure of the last 54 bases of the R3 RNA sequence (positions +1638 to +1692 relative to the stop codon TGA). Right panel: secondary structure of the mutated sequence. The arrow indicates the U-to-C mutation. (b) the mutated R3 hairpin motif impaired the interaction of HuR with the R3 region (lane 14). One experiment representative of the three performed is presented. RNP-IP experiments were performed with anti-HuR antibodies or preimmune serum (PIS) as a control, on total cell lysates from HEK 293T cells cotransfected with the pTarget-HuR and pMIR-Luc-MR 3'-UTR vectors. Lower panels: RT-PCR analysis of HPRT mRNA (inputs, left panel) and RNP-IP (right panel). Upper left panel: amplification of Luc-MR 3'-UTR, Luc-MR R1, Luc-MR R2, Luc-MR R3 and Luc-MR R4 transcripts (inputs, lanes 1-7). Upper right panel: amplification of Luc-MR 3'-UTR, Luc-MR R1, Luc-MR R2, Luc-MR R3 and Luc-MR R4 transcripts in RNP-IP from HuR-transfected cells (lanes 8, 10-13). (c) Luciferase activities in HEK 293T cells transfected with empty or pTarget-HuR vectors together with Luc, Luc-MR 3'-UTR, Luc-MR R3 or Luc-MR R3 mutant (mutR3) constructs. Data shown are means \pm SEM of three independent experiments ($n=6$). $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, significantly different from that measured in the absence of HuR, NS=non significant (Mann-Whitney U-test) (d) Schematic representation of the Luc-MR-3'-UTR and Luc-MR R2-3 constructs. Luc-MR R2-3 construct harbors both the ARE₃₋₆ (Tis11b targets) and the R3 hairpin motif (HuR Target) at nucleotide 1639 (black diamond). (e) Competition between Tis11b destabilizing function and HuR stabilizing function. KC3AC1 cells were transfected with the R2-3 construct and pSV- β gal plasmid. 24 h posttransfection, cells were exposed to isotonic (Iso), hypotonic (Hypo) or hypertonic (Hyper, 500 mOsmol l^{-1}) medium for 2 h, and then incubated in Iso or Hyper medium for 6 h, as indicated. Luciferase activities were normalized relative to β -galactosidase activities. Data shown are means \pm SEM of three independent experiments ($n=16$). $***P<0.001$ (Mann-Whitney U-test).

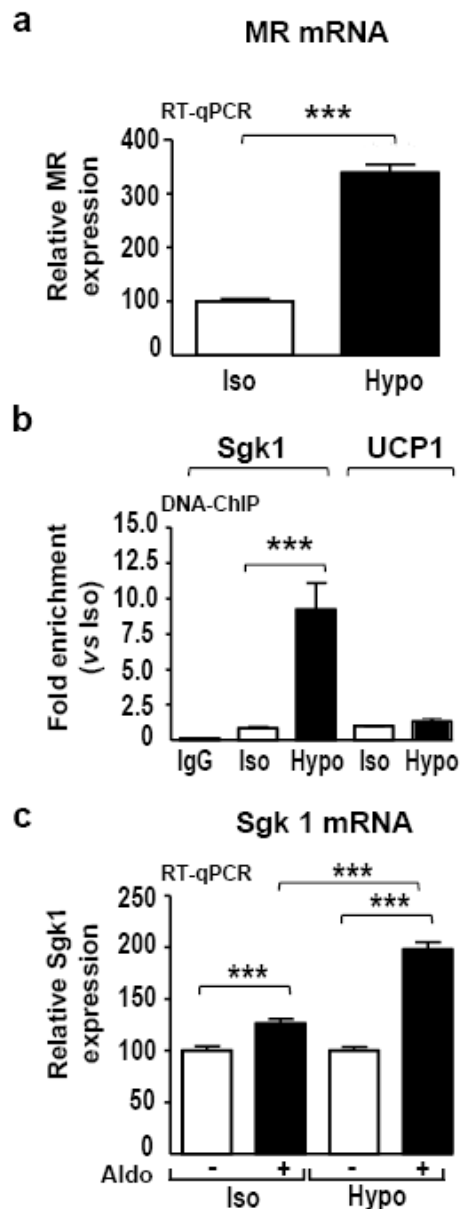


Figure 5. Hypotonicity potentiates aldosterone responsiveness in renal cells. (a) KC3AC1 cells cultured on filters were or were not subjected to hypotonic conditions at their apical surface for 6 h. MR expression was then analyzed by RT-qPCR with normalization relative to *18s* rRNA. The data shown are the means \pm SEM ($n=18$) of two independent experiments. $***P<0.001$ (Mann-Whitney U-test). (b) MR recruitment to the regulatory regions of the *Sgk1* promoter. KC3AC1 cells, cultured under isotonic (Iso) or hypotonic (Hypo) conditions, were stimulated by incubation for 1 h with 100 nM aldosterone. DNA-ChIP was performed as described in the methods section, with the MR 39N antibody or with a control IgG antibody. DNA was quantified by qPCR targeting the *Sgk1* promoter region. The results are expressed as DNA fold-enrichment in Hypo conditions relative to Iso conditions, as the mean \pm SEM of three independent experiments ($n=6-8$). $***P<0.001$, significantly different from Iso (Mann-Whitney U-test). The promoter region of the uncoupling protein 1 (*Ucp1*) gene was used as a negative control. (c) Hypotonicity potentiates aldosterone-induced *Sgk1* expression. KC3AC1 cells, grown for 7 days on filters, were cultured for 24 h in minimal medium and the cells were then either exposed or not to hypotonic conditions at their apical face for 18 h. The following day, the cells were left unstimulated or were stimulated with 10 nM aldosterone for 1 h in minimal medium. MR expression was analyzed by RT-qPCR and normalized relative to *36b4* mRNA. The data are shown as the means \pm SEM ($n=28-34$) of three independent experiments. $***P<0.001$ (Mann-Whitney U-test).

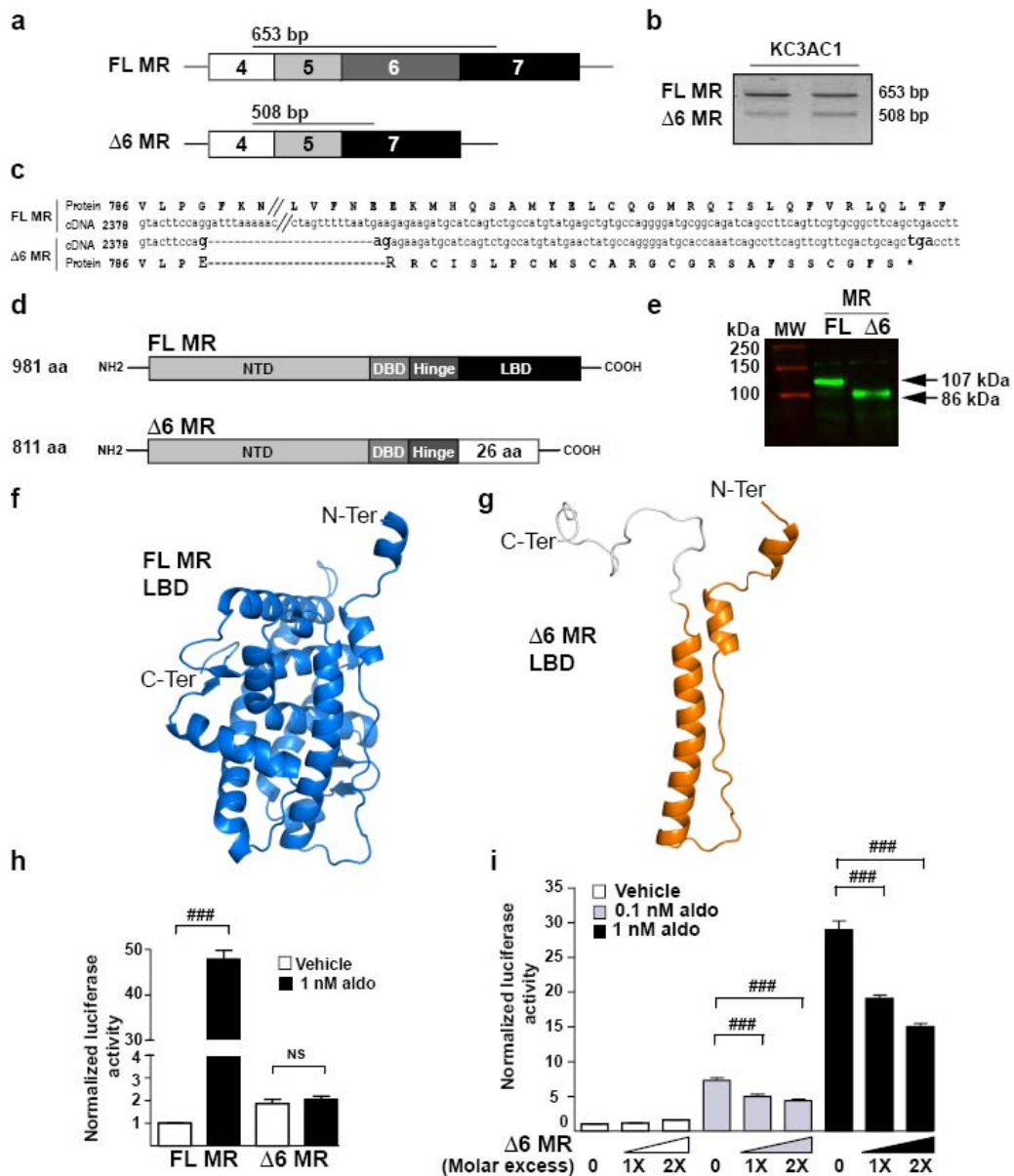


Figure 6. $\Delta 6$ MR is a new ligand-independent transactivator acting as a dominant negative isoform of FL MR. (a) Schematic representation of exons 4 to 7 of *Nr3c2* gene. Exon 6 is lacking from $\Delta 6$ MR. (b) RT-PCR amplification of FL MR (653 bp) or $\Delta 6$ MR (508 bp) from two KC3AC1 RNA samples. (c) Alignment of the FL MR and $\Delta 6$ MR sequences between exons 5 and 7. Nucleotides 2388 to 2532 (exon 6), have been omitted from the FL MR sequence (// symbol). Exon 6 deletion introduces a frameshift and creates a premature stop codon, leading to the production of a truncated MR protein, according to the predicted protein sequence for $\Delta 6$ MR. (d) Structure of FL MR and $\Delta 6$ MR proteins: NTD: N-terminal domain; DBD: DNA-binding domain; hinge domain; LBD: ligand-binding domain. The premature stop codon leads to deletion of most of the LBD domain in the $\Delta 6$ MR. (e) *In vitro* translation of plasmids encoding FL MR and $\Delta 6$ MR, followed by western blotting with the 39N MR specific antibody. FL MR (107 kDa) and $\Delta 6$ MR (86 kDa) proteins are visualized. (f, g) Three-dimensional models illustrating structures of FL MR (f) and $\Delta 6$ MR LBD (g). Helices (ribbons) and β strands (arrows) are shown, generated with PyMOL Molecular Graphics System. (h) $\Delta 6$ MR is a ligand-independent transactivator. HEK 293T cells were transfected as described in the methods section. The following day, cells were incubated for 24 h with ethanol (vehicle) or with 1 nM aldosterone. Luciferase activities were measured and normalized relative to β -galactosidase activities. Data shown are means \pm SEM ($n=8$). *** $p<0.001$; ### $p<0.001$ (Mann-Whitney U-test). (i) $\Delta 6$ MR acts as a dominant-negative transactivator of FL MR. HEK 293T cells were transfected with FL MR and with or without a one-fold (20 ng) or two-fold excess (40 ng) of $\Delta 6$ MR, as described above. Cells were incubated for 24 h with ethanol (vehicle) or with 0.1 or 1 nM aldosterone. Luciferase activities were measured as described above. Data shown are means \pm SEM of three independent experiments ($n=24$). *** $p<0.001$; ### $p<0.001$ (Mann-Whitney U-test).

Hypotonicity enhances renal MR signaling

Cortical collecting duct cells are physiologically exposed to isotonic basolateral interstitial fluid and hypotonic luminal fluid ranging from 60 to 300 mOsmol kg⁻¹. We reproduced such asymmetrical conditions with KC3AC1 cells cultured on filters¹⁷. The application of a hypotonic medium onto the apical surface of the cells led to a tripling of MR transcript levels (Fig. 5a). We investigated the effect of this increase in MR levels on hormone responsiveness, by performing DNA-ChIP experiments on KC3AC1 cells. We found that hypotonicity-induced increase in MR levels resulted in levels of aldosterone-stimulated recruitment of MR to the promoter of *Sgk1* nine times higher than those in isotonic conditions (Fig. 5b). MR was not recruited to the promoter of the *Ucp1* gene used as a negative control. The treatment of KC3AC1 cells with aldosterone for 1 h induced a significant 1.3-fold increase in *Sgk1* mRNA levels under isotonic conditions, whereas *Sgk1* levels doubled if the cells were bathed apically with hypotonic medium (Fig. 5c). These results suggest that renal cells respond to luminal hypotonic stress by promoting the recruitment of MR to the promoter regions of MR target genes, thereby enhancing aldosterone responsiveness.

Identification of a new Δ6 MR splice variant

HuR also acts as a splicing factor, by promoting exon skipping events or blocking the action of TIA-1/TIAR proteins, which promote 3'-terminal exon inclusion^{40,41,42}. Several MR variants have already been described. We therefore hypothesized that HuR might also play a role in MR transcript processing. Specific PCR amplification of reverse-transcribed cDNA isolated from KC3AC1 cells with exon-specific oligonucleotides (Fig. 6a) generated 653 bp and 508 bp amplicons potentially corresponding to the FL MR and an unrecognized splice variant of MR, respectively (Fig. 6b). Further sequencing of these fragments identified a new MR variant lacking the entire exon 6, which we named Δ6 MR (Fig. 6b and Supplementary Fig. 5b). The skipping of exon 6 leads to an open reading frameshift, generating a premature stop codon. Sequence comparison revealed that the ligand-binding domain (LBD) of murine Δ6 MR was conserved up to the Pro788 residue (Pro794 in hMR), with the rest of the LBD (residues 789 to 978 in the murine FL MR) replaced with a shorter (26 amino

acids) C-terminal tail (Fig. 6c), resulting in a truncated protein (86 kDa for $\Delta 6$ MR and 107 kDa for FL MR; Fig. 6d), as suggested by *in vitro* translation of the $\Delta 6$ MR transcript followed by western blotting (Fig. 6e). We generated three-dimensional homology models of the murine FL MR and $\Delta 6$ MR, using crystal structure of the human MR LBD as a template. As shown in Fig. 6f, FL MR LBD adopts the canonical fold of the nuclear receptor LBD, encompassing the Nter-H1, H1, and H3 to H12 helices. In sharp contrast, $\Delta 6$ MR LBD contains only the Nter-H1, H1 and H3 helices (Fig. 6g). The short C-terminal tail, which has no structural homolog, is modeled as an unstructured coil. The H1 and H3 helices are part of the LBD scaffold and the absence of the rest of the domain probably results in an unstable truncated LBD. We then investigated subcellular distribution of FL MR and $\Delta 6$ MR, by transfecting COS 7 cells with vectors encoding these proteins. Immunocytochemistry and HTM showed that $\Delta 6$ MR was mostly present in the nucleus, in both the presence and absence of aldosterone (Supplementary Fig. 6). By contrast, FL MR was found in both the cytoplasm and the nucleus in the absence of ligand, and was translocated into the nucleus after treatment of the cell for 1 h with aldosterone, as previously described^{42,43}.

The ligand-independent $\Delta 6$ MR is a dominant-negative effector of FL MR

We then investigated the functional properties of the $\Delta 6$ MR splice variant. We showed that $\Delta 6$ MR activated transcription of the glucocorticoid response element 2 (GRE2)-driven luciferase construct in a dose-dependent manner (Supplementary Fig. 7). Interestingly, basal transactivating activity of $\Delta 6$ MR was twice as strong as that of FL MR ($***P < 0.0002$, Fig. 6h). By contrast, aldosterone increased FL MR-mediated GRE2-driven luciferase activity by a factor of 50, whereas the $\Delta 6$ MR variant was insensitive to aldosterone stimulation (Fig. 6h), consistent with a ligand-independent transactivating function of this LBD-lacking receptor. We also investigated whether the presence of the $\Delta 6$ MR variant affected FL MR activity. We transfected HEK 293T cells with various amounts of $\Delta 6$ MR-encoding plasmid and a constant amount of FL MR-encoding plasmid. The use of equimolar concentrations of FL MR- and $\Delta 6$ MR-encoding plasmids result in significantly lower levels of aldosterone-stimulated luciferase activity (40% lower than those in the absence of the $\Delta 6$ MR-

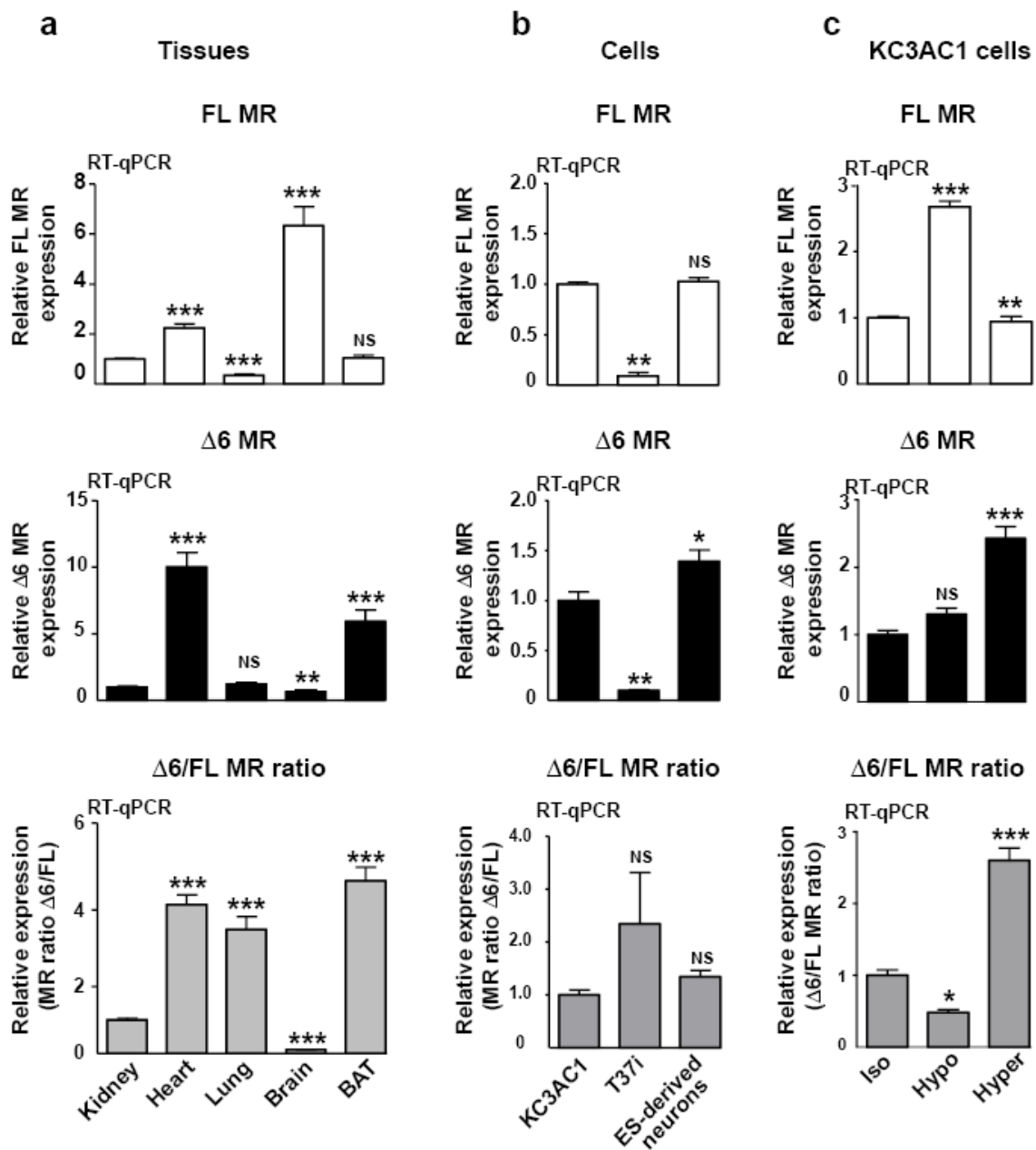


Figure 7. $\Delta 6$ MR is expressed in mouse MR-expressing tissues and cells, and is regulated by extracellular tonicity. (a, b) RT-qPCR analysis of MR expression (FL and $\Delta 6$ MR). The FL MR and $\Delta 6$ MR transcripts were reverse-transcribed and amplified with Taqman probes from several mouse epithelial and non-epithelial MR-expressing tissues or cell lines (KC3AC1, T37i cells, ES-derived neurons). The expression of FL MR or $\Delta 6$ MR, normalized relative to *18s* rRNA, is expressed as a fold-induction relative to the level of expression in the kidney or in KC3AC1 cells, arbitrary set at 1. The $\Delta 6/FL$ MR ratio was also determined for each tissue or cell line. The data shown are the means \pm SEM ($n=12-18$) of three and two independent experiments, for each tissue and cell line, respectively. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS=not significant (Mann-Whitney U-test). (c) MR expression (FL MR and $\Delta 6$ MR) was also analyzed by RT-qPCR in KC3AC1 cells subjected to isotonic (Iso), hypotonic (Hypo) or hypertonic (Hyper) conditions for 6 h. FL MR or $\Delta 6$ MR expression is presented as described above (fold-induction relative to the level of expression in control cells [Iso], arbitrarily set at 1). The $\Delta 6/FL$ MR ratio was also determined for each set of conditions. The data shown are the mean \pm SEM ($n=16$) of two independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS=not significant (Mann-Whitney U-test).

encoding plasmid; Fig. 6i). This dominant-negative effect of $\Delta 6$ MR in transfected cells was dose-dependent (Fig. 6i).

$\Delta 6$ MR expression and its regulation by tonicity

Expression of this splice variant was analyzed further in MR-expressing tissues and cells, by RT-qPCR with exon-specific primers and Taqman probes for the selective quantification of each MR transcript. As expected, FL MR transcript was detected in the kidney, lung, and brown adipose tissue (BAT), but its expression levels were also high in the brain (6 times higher than in the kidney) and heart (2.5 times higher than in the kidney) (Fig. 7a, upper panel). Relative levels of $\Delta 6$ MR transcript were low, corresponding to about 1% the relative levels of FL MR (4×10^{-3} attomol of $\Delta 6$ MR vs. 4×10^{-1} attomol of FL MR/ μg RNA), but a differential pattern of $\Delta 6$ MR expression was observed in these MR-expressing tissues (Fig. 7a, middle and lower panels), with the highest expression levels observed in the heart and BAT, highlighting the conservation of these alternative splicing events for the regulation of MR expression. We also measured $\Delta 6$ MR expression in KC3AC1 renal cells, T37i brown adipocytes and embryonic stem cell-derived neurons (Fig. 7b). As expected, FL MR transcript levels were highest in renal and ES-derived neuronal cells and $\Delta 6$ MR transcript levels were about 1% those for FL MR. $\Delta 6$ MR expression levels in brown adipocytes were about one tenth those in renal cells. We also investigated the possible effect of osmotic stress on this splicing process, by exposing KC3AC1 cells to isotonic, hypotonic and hypertonic ($500 \text{ mOsmol l}^{-1}$) media. FL MR levels were increased by hypotonic stress, whereas such stress had no significant effect on $\Delta 6$ MR variant, resulting in a lower $\Delta 6$ /FL MR ratio (Fig. 7c). Conversely, hypertonicity decreased levels of FL MR but not of $\Delta 6$ MR, resulting in a higher $\Delta 6$ /FL MR ratio. These data indicate that hypoosmotic stress modulates renal MR transcript splicing and expression to promote aldosterone responsiveness through fully functional FL MR signaling.

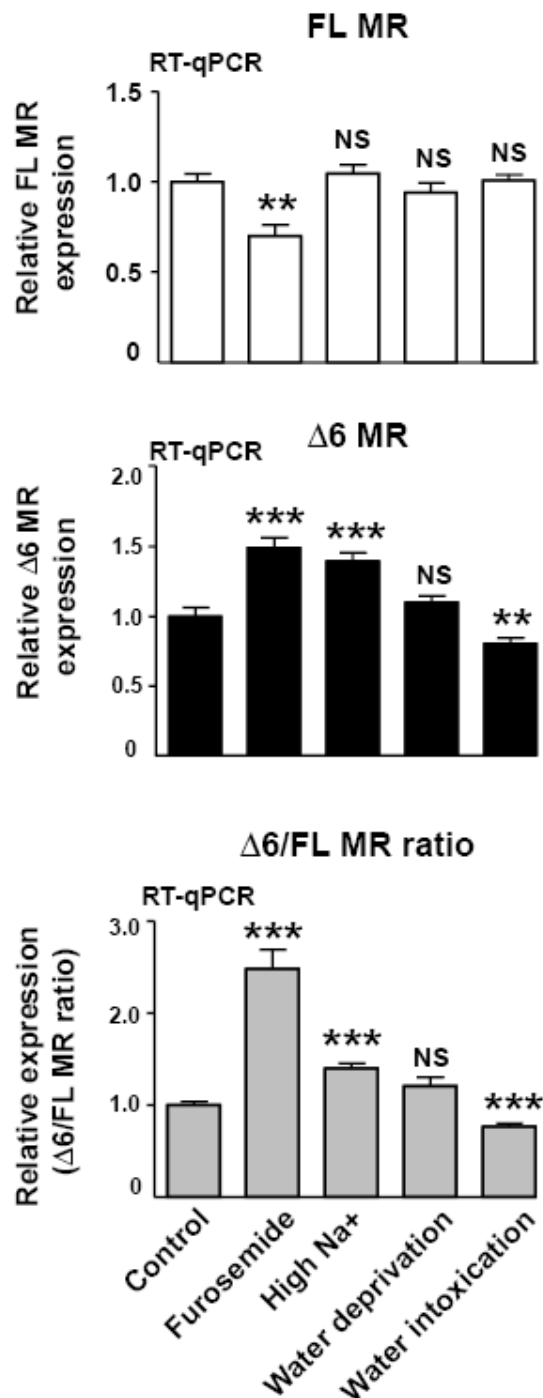


Figure 8. The osmotic corticopapillary gradient modulates renal $\Delta 6$ MR expression in vivo. RT-qPCR analysis of MR expression (FL MR and $\Delta 6$ MR) in the kidneys of mice subjected to furosemide treatment, a high Na⁺ diet, water deprivation or water intoxication. The FL MR and $\Delta 6$ MR transcripts were reverse-transcribed and amplified specifically with Taqman probes. Levels of mRNA for the FL MR or $\Delta 6$ MR were normalized relative to 18s rRNA and expressed as a fold-induction relative to the level of expression in the kidneys of control animals, arbitrarily set at 1. The data shown are the means \pm SEM ($n=10-24$) of two independent experiments. The $\Delta 6$ /FL MR ratio was also determined for each set of conditions. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS=not significant (Mann-Whitney U-test).

An altered osmotic gradient modulates renal $\Delta 6$ MR expression in vivo

We evaluated the pathophysiological relevance of our findings, by analyzing renal $\Delta 6$ MR expression in mice subjected to various experimental challenges, such as furosemide exposure, a high-sodium diet, water deprivation and water intoxication. These conditions are known to alter osmotic corticopapillary gradients and to modify sodium fluxes in distal parts of the nephron. Furosemide, a loop diuretic, inhibits NKCC2 and increases sodium delivery to the cortical collecting ducts and luminal osmolarity; it significantly decreased renal FL MR levels and increased $\Delta 6$ MR splice variant levels (Fig. 8), resulting in a higher $\Delta 6$ /FL ratio. In sharp contrast, neither high-sodium diet nor overnight water deprivation affected renal FL MR levels, whereas $\Delta 6$ MR levels were increased by a high-sodium diet and remained unchanged following overnight water deprivation. There was, therefore, a small but significant increase in $\Delta 6$ /FL ratio in kidneys of animals fed a high-sodium diet, whereas this ratio was not modified by water deprivation (Fig. 8, lower panel). Water intoxication, a condition of relative hypotonicity of luminal cortical fluid, did not modify total renal MR levels, but it did significantly decrease $\Delta 6$ MR levels, resulting in a decrease in $\Delta 6$ /FL ratio consistent with our observations *in vitro* for KC3AC1 cells exposed to hypotonic stress (Fig. 7c, lower panel). These results indicate that, *in vivo*, changes in hydroelectrolyte balance radically alter renal MR expression in terms of mRNA levels for both FL MR and its splice variant $\Delta 6$ MR.

HuR is instrumental in hypotonicity-induced $\Delta 6$ MR processing

We generated stably transfected KC3AC1 cell lines, using short-hairpin RNA (shRNA) to knock down HuR expression, to demonstrate unambiguously the direct relationship between HuR and $\Delta 6$ MR splice variant expression. KC3AC1 cells expressing scrambled (Scr_shRNA) or HuR (HuR_shRNA) shRNA were incubated in isotonic or hypotonic media. Silencing efficiency was determined by RT-qPCR and western blotting. Hypotonic stress did not affect HuR mRNA or protein levels. HuR mRNA levels were significantly decreased by HuR_shRNA in isotonic or hypotonic conditions, resulting in a parallel decrease in the level of the protein (Fig. 9a, 9b and 9c). This decrease in HuR levels was confirmed by immunocytochemistry coupled to HTM quantification, but some HuR remained in the

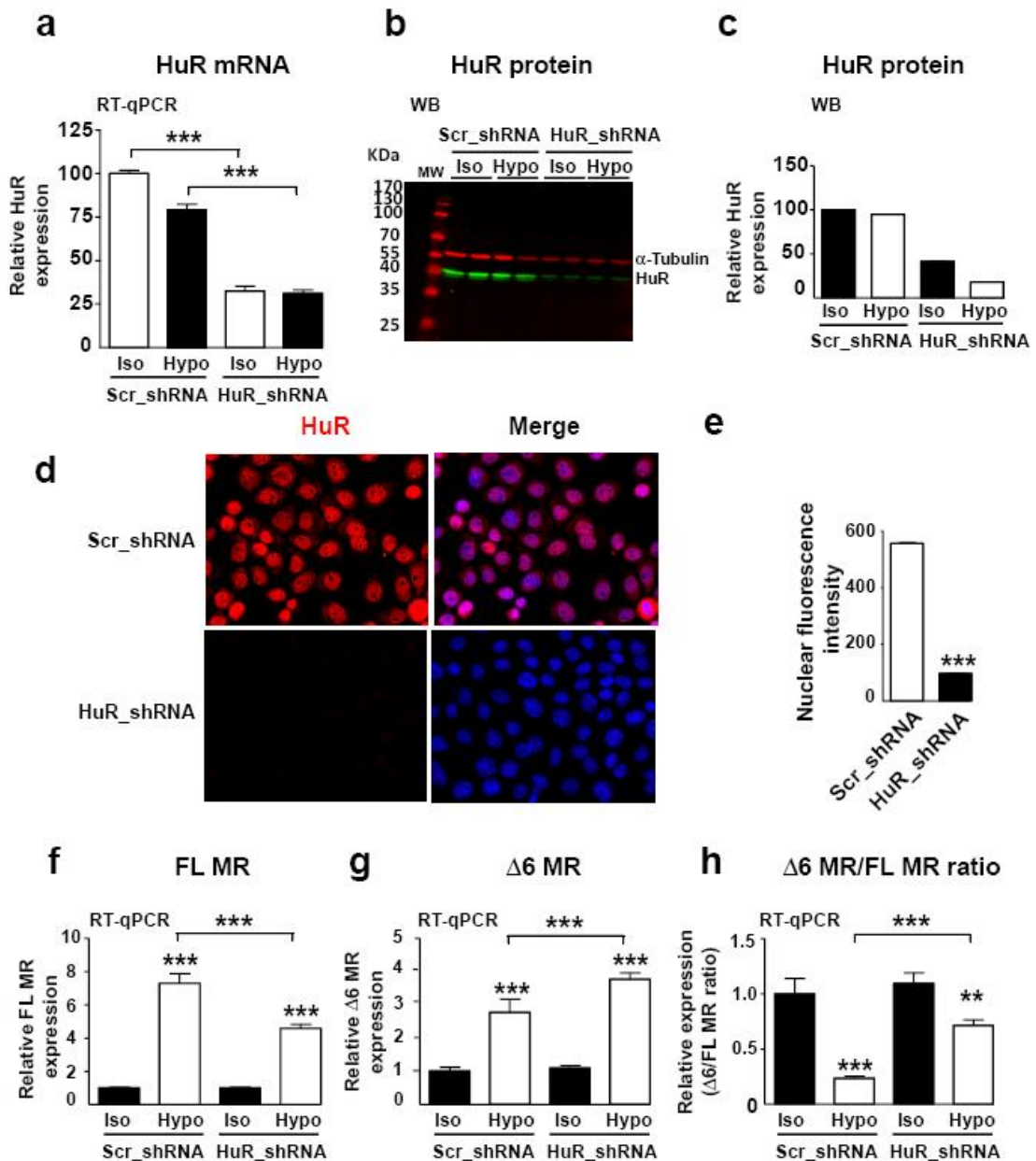


Figure 9. HuR favors exon 6 inclusion in the MR transcript, thereby promoting the production of the full-length MR under hypotonic conditions. KC3AC1 cells stably expressing scrambled (Scr) or HuR short hairpin RNAs (shRNA, clone 14), were cultured under isotonic (Iso) or hypotonic (Hypo) conditions for 6 h. **(a)** HuR mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized relative to *Gapdh* mRNA levels. The values shown are means \pm SEM ($n=20-24$). *** $p<0.001$ (Mann-Whitney U-test). **(b-c)** HuR protein levels were analyzed by WB **(b)** in KC3AC1 cells expressing Scr_ or HuR_shRNA. Alpha-tubulin was used as a loading control. Relative levels of HuR, based on the quantification of band intensity, are shown in **(c)**. The data shown are the means of two independent determinations. **(d)** Immunodetection of HuR in KC3AC1 cells stably expressing Scr_shRNA or HuR_shRNA. The nuclei were stained with DAPI. **(e)** HuR expression was quantified by automated high-throughput microscopy, as described in the methods section. The results are expressed as the mean nuclear fluorescence intensity. HuR expression was decreased by $\sim 90\%$ in cells transfected with the HuR-shRNA. *** $P<0.001$, $n>5000$ cells in each set of conditions (Mann-Whitney U-test). **(f)** RT-qPCR analysis of FL MR and **(g)** $\Delta 6$ MR in KC3AC1 cells stably expressing either Scr_shRNA or HuR_shRNA, cultured under isotonic (Iso) or hypotonic (Hypo) conditions for 6 h. The FL MR and $\Delta 6$ MR transcripts were reverse-transcribed and amplified in a specific manner, as described above, with Taqman probes, and their levels were normalized relative to *Gapdh* mRNA. **(h)** The $\Delta 6$ MR/FL MR ratio is also presented. Note that knocking down HuR expression with HuR_shRNA significantly limited the hypotonicity-induced decrease in $\Delta 6$ MR/FL MR ratio. The data shown are the means \pm SEM ($n=26$ to 36) of three independent experiments. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ (Mann-Whitney U-test).

nucleus (Fig. 9d and 9e). RT-qPCR analysis revealed that hypotonicity increased FL MR and $\Delta 6$ MR levels in KC3AC1 cells stably transfected with Scr_shRNA or HuR_shRNA. However, the knockdown of HuR expression significantly decreased FL MR levels whilst increasing those of $\Delta 6$ MR (Fig. 9f and 9g). Finally, $\Delta 6$ /FL MR ratio was significantly decreased by hypotonicity (Fig. 9h) in KC3AC1 cells stably transfected with scr_shRNA (as expected, see Fig. 7c, lower panel). This effect was partially prevented in KC3AC1 cells stably transfected with HuR_shRNA, indicating that HuR plays a crucial role in the control of $\Delta 6$ MR expression in renal cells.

Discussion

We recently showed that extracellular tonicity modulates MR expression at the posttranscriptional level¹⁷ and demonstrated that hypertonicity strongly induces expression of the RBP Tis11b, leading to MR mRNA degradation, resulting in blunted responses to aldosterone stimulation and impaired MR signaling¹⁹.

We show here that such posttranscriptional events also control MR expression under conditions of hypotonicity. We identified HuR as the major mediator of this hypotonicity-induced increase in MR expression. This RBP regulates levels of short-lived mRNAs, in an adaptive response to various stress stimuli²¹.

HuR is mostly located in the nucleus, so its export to the cytoplasm is a key prerequisite for stabilization of transcripts by this protein. We found that HuR export is rapidly induced by hypotonicity and is reversible. We also observed that leptomycin B, an inhibitor of the CRM1 (Chromosomal Maintenance 1, also known as Exportin 1)-dependent export pathway, was unable to inhibit the export of HuR in KC3AC1 cells (Supplementary Fig. 8), whereas this molecule inhibits the TGF β 1-induced accumulation of HuR in the cytoplasm of hepatic cells⁴⁴. These results suggest that HuR is exported from the nucleus in a CRM1-independent manner in renal cells. The bidirectional shuttling of HuR between the nucleus and cytoplasm is clearly a complex mechanism involving different export routes for different environmental stimuli. Interestingly, Fan *et al.* identified a shuttling sequence in the hinge region of the HuR protein that they referred to as the “HuR nucleo-cytoplasmic shuttling” sequence⁴⁵. This shuttling sequence contains key pivotal amino acids that are indirectly or directly phosphorylated by kinases, such as the cell-cycle checkpoint kinase 2, the p38 MAP kinase or the members of the protein kinase C family³², thus promoting the export of HuR. Similarly, Doller *et al.* demonstrated that angiotensin II promoted nuclear export of HuR, which was blocked by the PKC inhibitor rottlerin⁴⁶. It remains to be determined whether these kinases are involved in HuR export in KC3AC1 cells. The subcellular distribution of HuR seems to be highly dependent on cell type, given that this protein accumulates in the cytoplasm under hypotonic stress in renal cells but not in human fibroblasts (Supplementary Fig. 3). Overall, our data indicate that

hypotonic stress should be considered an external stimulus capable of inducing nuclear export of HuR, together with UV radiation, hypoxia, energy deprivation and oxidative stress^{32,47,48}.

Several complementary approaches (RNP-IP, mutagenesis and transfection) were used to define the region of MR 3'-UTR interacting directly with HuR. Surprisingly, we identified a hairpin RNA secondary structure in the R3 region (Supplementary Fig. 4) similar to that already described in the 3'-UTR of the PTMA and MTA1 transcripts^{35,37}, which mediated physical interaction with HuR. This RNA motif plays a key role in the binding of HuR to MR transcript and in the stabilization of this transcript, because a U-to-C substitution completely disrupted R3/HuR complexes and abolished R3-driven luciferase activity. However, the functional importance of the secondary structure remains a matter of debate. Indeed, some authors believe that HuR binds its RNA target with no preference for a hairpin RNA secondary structure²⁴, whereas others have provided evidence suggesting that this secondary structure enhances the recognition of mRNA targets by HuR⁴⁹. At variance, we recently showed that Tis11b interacts with simple primary sequences corresponding to the ARE₃ and ARE₄ motifs to exert its destabilizing activity¹⁹. We and others have also reported the ability of HuR and other RBP to compete for the same recognition sequences. For instance, HuR and AUF1 have been shown to bind the same sequence in the 3'-UTR of the androgen receptor⁵⁰, whereas Tis11b and HuR have antagonistic effects on the VEGF 3'-UTR *in vitro*³⁸. ARE₃ and ARE₄ are not located in the close vicinity of the hairpin secondary structure of the R3 region of the RNA, but we could not rule out the possibility of competition between HuR and Tis11b, due to the non-linear structure of mRNA. We therefore generated the R2-3 plasmid construct and demonstrated the recruitment of both endogenous HuR and Tis11b to the MR 3'-UTR following exposure to hypotonicity and hypertonicity in KC3AC1 cells, thus providing direct evidence for antagonistic effects of these RBP on MR transcript stability in renal cells, depending on the type of osmotic stress. MicroRNA (miRNA), another class of posttranscriptional regulators, have also been shown to interact physically and functionally with HuR. Combinatorial or cooperative interplay between HuR and miRNA on shared target mRNA molecules may typically result in the enhancement or repression of gene expression⁵¹. Overall, these data suggest that RBP and miRNA belong to a network of posttranscriptional regulators modulating gene

expression. The identification of the miRNAs involved should provide new insight into the posttranscriptional mechanisms controlling physiological or pathophysiological situations, such as renal fibrosis in diabetic nephropathy⁵².

Finally, we showed that hypotonicity increased MR transcript levels and MR recruitment to the promoter of the *Sgk1* gene. Our data also demonstrate that hypotonicity significantly potentiates the aldosterone-induced expression of the kinase Sgk1, activating MR signaling. It remains to be determined whether such posttranscriptional events occur *in vivo*, in other nephronic segments or in other MR-expressing tissues, because these mechanisms may be reminiscent of pathophysiological situations in which the renal corticopapillary gradient is altered during osmotic diuresis, such as in nephrogenic diabetes insipidus⁵³.

In addition to its fundamental role in mRNA stability, HuR is also involved in RNA processing^{21,54}. Indeed, HuR has been shown to promote exon 6 skipping in the transcript of the apoptosis receptor Fas, resulting in the generation of a soluble isoform that prevents programmed cell death⁵⁵. HuR binding to the alternative 3'-terminal exon in pre-messenger target transcripts has also been shown to promote their splicing⁴¹. Given this dual function of HuR, we speculated that HuR might process the MR transcript in renal cells. We identified a novel MR splice variant ($\Delta 6$ MR) resulting from a HuR-dependent exon 6 skipping event. The $\Delta 6$ MR variant encodes a truncated MR protein, lacking the LBD, which is replaced with a shorter 26 aa C-terminal tail that is 90% identical to the previously discovered human $\Delta 5.6$ MR splice variant³⁰. The h $\Delta 5.6$ MR variant has dominant-positive effects, whereas the murine $\Delta 6$ MR is constitutively active and exerts dominant-negative effects on the transcriptional activity of the FL MR. A large number of naturally occurring C-terminal splice variants of other nuclear receptors (e.g. GR β , ER β , TR α , DAX-1) have been identified⁵⁶. None can bind endogenous ligands but all display dominant-negative activity. Several mechanisms may account for the negative interfering effect of $\Delta 6$ MR on MR signaling. There may be competition for binding to the hormone response element on the DNA, with $\Delta 6$ MR homodimers or heterodimeric $\Delta 6$ MR- and FL MR-containing complexes decreasing the transcriptional activity of FL MR. An alternative, non-mutually exclusive explanation is that, as coregulators form a functional link between the liganded

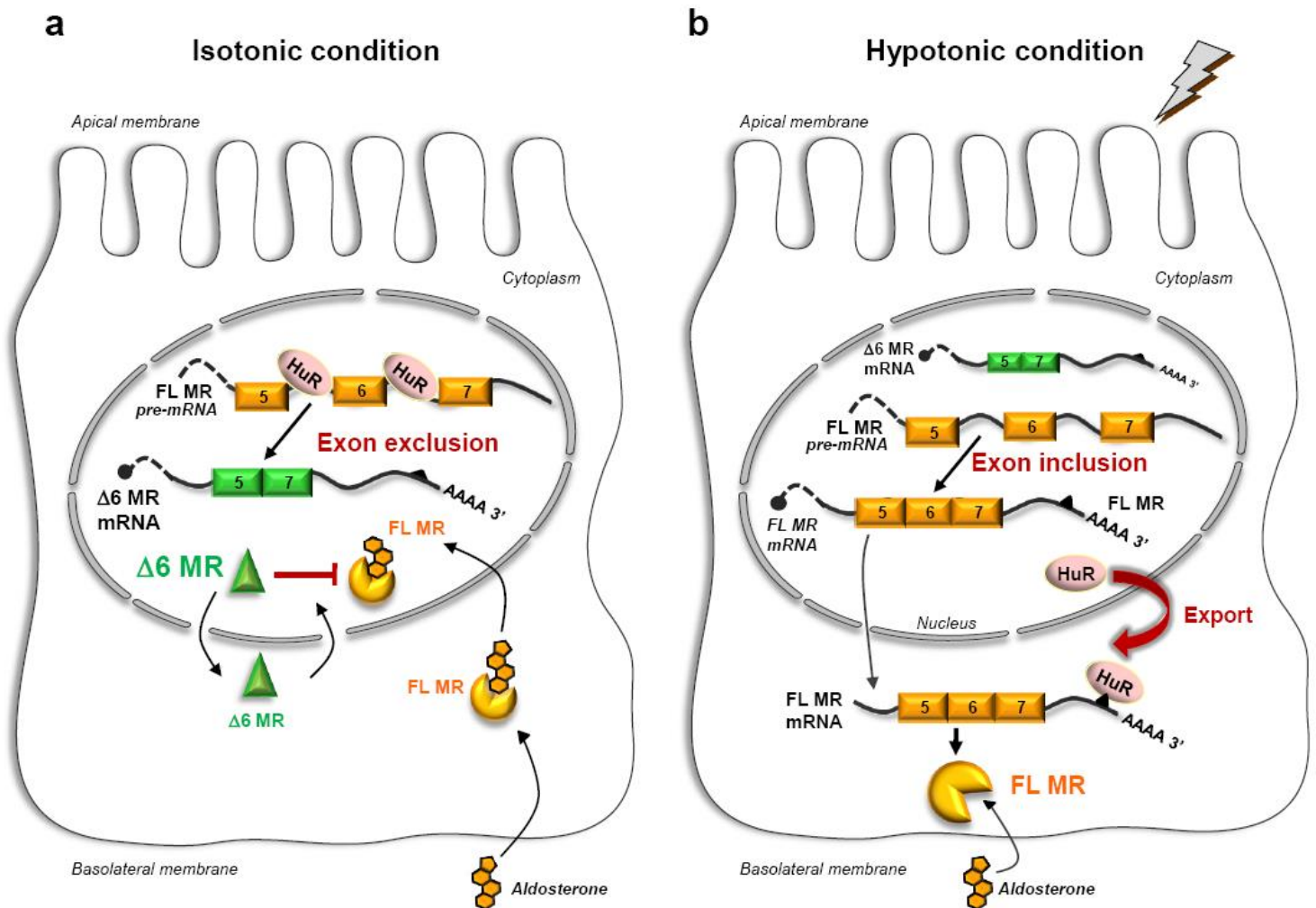


Figure 10. Proposed model for the posttranscriptional control of renal MR expression by HuR. (a) Under isotonic conditions, HuR is located in the nucleus, where it splices the MR transcript (exon exclusion) to generate the $\Delta 6$ MR splice variant, which entirely lacks exon 6 of the MR transcript. The $\Delta 6$ MR protein, the production of which is regulated by tonicity, exerts dominant negative effects on the transcriptional activity of the full-length MR. (b) Under hypotonic conditions, HuR is rapidly exported to the cytoplasm, reducing the amount of HuR in the nucleus and facilitating generation of the full-length MR transcript (exon inclusion). In the cytoplasm, HuR stabilizes the MR transcript by interacting with its 3'-UTR, thereby ultimately enhancing renal MR signaling. FL: full-length; MR: mineralocorticoid receptor; HuR: Hu antigen R.

receptor and the basal transcription machinery, transcriptional partners, including corepressors in particular, may be involved, explaining the negative interference of $\Delta 6$ MR with FL MR activity.

It should be noted that $\Delta 6$ MR is expressed in all mineralocorticoid-sensitive tissues and cells. However, its abundance relative to that of FL MR is highly variable, with $\Delta 6$ /FL MR ratios in the heart, lung and BAT about four times higher than that in the kidney, but lower in the brain. These findings suggest that $\Delta 6$ MR may modulate mineralocorticoid signaling in a tissue- and cell-specific manner. Extensive analyses of $\Delta 6$ MR expression and regulation in normal and pathophysiological situations should provide greater insight into the mechanisms regulating MR-mediated signaling. It would be interesting to study $\Delta 6$ MR expression in human mineralocorticoid resistance syndromes, in which this splice variant might exert dominant-negative effects. For instance, Leung *et al.* demonstrated that glucocorticoid-insensitive asthma is associated with an increase in levels of the GR β splice variant, which antagonizes GR α ⁵⁷.

Another original finding was the demonstration that $\Delta 6$ MR expression is regulated by osmotic stress. Indeed, the $\Delta 6$ /FL MR ratio in renal cells decreased by 50% in hypotonic conditions, but tripled under hypertonic conditions, clearly demonstrating that regulation of $\Delta 6$ MR and FL MR expression similarly operates both *in vitro* and *in vivo*.

Finally, we used an RNA interference strategy to demonstrate the involvement of HuR in the splicing of the MR transcript. The hypotonicity-induced decrease in relative $\Delta 6$ MR levels was limited in the absence of HuR, providing additional support for the crucial role played by HuR in controlling renal mineralocorticoid signaling. Overall, our findings shed new light on the fascinating dual role of HuR as a master regulator of FL MR expression and as a stabilizing and splicing factor for the MR transcript.

In conclusion, we have demonstrated regulation of the alternative splicing of the MR pre-mRNA by hypotonic stress and the stabilization of the MR transcript by HuR to potentiate the response to aldosterone in renal cells. We propose a model in which HuR is mostly present in the nucleus in isotonic conditions (Fig. 10) and behaves as a splicing factor, promoting the removal of exon 6 from the MR pre-mRNA. This alternative splicing gives rise to the $\Delta 6$ MR splice variant, a ligand-independent transactivator exerting dominant-negative effects on FL MR-mediated transcriptional

activity. Conversely, hypotonicity triggers the rapid, transient and reversible export of HuR to the cytoplasm, decreasing the amount of nuclear HuR and promoting exon 6 inclusion, resulting in the FL MR mRNA. Concomitantly, cytoplasmic HuR binds the MR 3'-UTR, notably on a specific hairpin secondary structure, thus enhancing MR expression and signaling and potentiating renal aldosterone responsiveness. We therefore suggest that HuR is a physiological regulator of renal MR abundance, which is a key molecular determinant for the MR-mediated signaling pathway. MR expression is profoundly altered in various pathophysiological states. It will be important to determine whether such mechanisms occur in other nephronic segments and in other MR-expressing cells (colon, inner ear, heart, neurons, etc.) because other stresses (oxygen depletion, oxidative stress, energy shortage) are probably involved in the rapid regulation of MR expression and splicing, and, ultimately, in mineralocorticoid-related signaling.

Methods

Cell culture. HEK 293T and COS 7 cells were cultured in DMEM medium supplemented with 2 mM glutamine, 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin, and 10% fetal calf serum (Biowest). All reagents were from Life Technologies unless otherwise stated. KC3AC1 cells were cultured under isotonic conditions, at 300 mOsmol l⁻¹, as previously described¹⁷. Hypotonic conditions (150 mOsmol l⁻¹) were achieved by two-fold dilution of the medium in sterile water. Minimal medium lacking dexamethasone (Sigma Aldrich), epidermal growth factor (EGF, Peprotech), triiodothyronine (T3, Sigma Aldrich) and dextran charcoal-coated (DCC) serum was used to study aldosterone action (Sigma Aldrich).

Plasmid constructs. Human MR (hMR) 3'-UTR (full-length and truncated) sequences were obtained by PCR from genomic DNA. Luciferase-MR-3'-UTR fusion constructs were generated as previously described¹⁹. Human R2-3 MR 3'-UTR was generated by PCR with the R2 sense and R3 antisense primers. Site-directed mutagenesis of the R3 hairpin motif was performed with the QuikChange kit (Stratagene) with specific primers. The full-length (FL) coding sequence of the mouse MR (mMR) was obtained by amplifying the renal cDNA by PCR and inserting it into the pcDNA3.1 vector (Thermo Fisher). Long site-directed mutagenesis of mouse Δ6 MR was performed with the Q5 Site-Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs), with specific primers designed with the NEBaseChanger website (<http://nebasechanger.neb.com/>), using the FL mMR-pcDNA3.1 plasmid as the template. All primer sequences are indicated in Supplementary Table 2.

Transfection assays. HEK 293T cells were transfected with luciferase constructs (FL, mutated or truncated sequences, 1 ng) and with an empty or HuR-encoding pTarget vector (25 ng), in the presence of Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Luciferase activities, normalized relative to *Renilla* luciferase activities, were measured 24 h posttransfection, as previously described³³. COS 7 cells were cultured for 24 h in the presence of complete medium supplemented with 10% DCC serum. Transfections were performed in four-well chamber slides (Sarstedt), with 500 ng of FL MR- or Δ6 MR-encoding vector, in the presence of Lipofectamine 2000. KC3AC1 cells were transfected at 70-

80% confluence, with the R2-3 plasmid construct (20 ng) and pSV- β gal (35 ng), in the presence of Lipofectamine 2000. Then, 24 h posttransfection, the cells were incubated for 2 h under isotonic (Iso), hypotonic (Hypo) or hypertonic (Hyper) conditions, before being returned to Iso or Hyper conditions, as indicated in the legend to Fig. 4e. Cells were then lysed by incubation with Passive 1X Lysis Buffer (Promega) for 30 min with shaking, and luciferase activity was determined and normalized relative to β -galactosidase activity. The functionality of mouse FL MR and Δ 6 MR was assessed by transfecting HEK 293T cells with FL MR and Δ 6 MR expression vectors and replacing the transfection medium, 6 h after transfection, with HEK 293T cell medium supplemented with 10% DCC-treated serum. The following day, cells were cultured for 24 h in the presence or absence of aldosterone (0.1 nM to 10 nM). Luciferase activities were normalized relative to β -galactosidase activities.

Ribonucleoprotein immunoprecipitation (RNP-IP). RNP-IP was performed as previously described³³ in HEK 293T cells cotransfected with luciferase (Luc)-MR 3'-UTR- and HuR-encoding plasmids (500 ng and 100 ng, respectively) or in KC3AC1 cells exposed to hypotonicity. Luc-MR 3'-UTR, MR or HPRT transcripts were amplified with the specific primers described in Supplementary Table 2.

DNA-Chromatin immunoprecipitation (DNA-ChIP). Differentiated KC3AC1 cells were cultured in isotonic (Iso) or hypotonic (Hypo) medium for 18 h, and DNA-ChIP was then performed with the HighCell# ChIP kit (Diagenode), as previously described⁵⁸. Sheared chromatin (1.3 mg protein) was resuspended in 500 μ l of C1 buffer containing 7 μ g of 39N anti-MR antibody and 25 μ l of protein A-coated beads, and incubated overnight at 4°C in a rotating shaker. DNA fragments from the immunoprecipitated chromatin and from input samples (1% sheared chromatin) were eluted with DIB buffer (DNA Isolation Buffer, Diagenode) supplemented with 1% proteinase K, and quantified by qPCR with specific genomic primers (see Supplementary Figure 2).

RNA interference. KC3AC1 cells were transfected twice (on days 6 and 7 of cell culture) with 50 nM HuR siRNA or scrambled siRNA (#s2090, and #4390843, Life Technologies), with the RNAimax

transfection reagent (Life Technologies). Cells were then exposed to hypotonic conditions for various periods of time and MR expression was quantified by RT-qPCR. We generated KC3AC1 cell lines stably expressing shRNA, by transfecting cells with 10 µg of HuR shRNA-encoding plasmid (#TRCN0000112085 or #TRCN0000112087, Sigma Aldrich) or a control (scrambled) shRNA-encoding plasmid (#SHC002), in the presence of Lipofectamine 2000. Then, 24 h after transfection, we added 1 µg ml⁻¹ puromycin to the medium for the selection of transfected clones. Clonal cells were obtained by limiting dilution of the cell suspension and routinely cultured in the presence of puromycin.

Quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from cells or tissues with TRI Reagent (Euromedex). A TissueLyser apparatus (Qiagen) was used for tissue extraction. RT-qPCR was performed as previously described¹⁷. The RNA was treated with DNase I (New England Biolabs), and 1 µg of total RNA was then reverse-transcribed with the High Capacity cDNA reverse transcription kit. Relative gene expression was analyzed on a QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Life Technologies), by qPCR with the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) and the specific primers described in Supplementary Table 2. Relative expression in a given sample was calculated as amol of the specific gene fmol⁻¹ of *18S*, *36b4* or *Hprt*, as stated in the corresponding figure legends.

Taqman assays. Samples were analyzed with Taqman® Universal Master Mix Reagent (Life Technologies), with specific primers and probes (see Supplementary Table 2) and the QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System. Relative expression was calculated for each sample as the amol of the gene of interest fmol⁻¹ of *18S*, or *gapdh*. The specificity of each primer/probe set was confirmed by preliminary experiments with plasmid constructs corresponding to FL MR or Δ6 MR. No cross-reaction was observed between the FL MR primers and Δ6 MR probe or between the Δ6 MR primers and FL MR probe, confirming that each primer/probe set amplified only its specific target.

Immunocytochemistry. KC3AC1 cells were used to seed four-well tissue culture chambers (Sarstedt). After 24 h, the cells were incubated under isotonic (Iso) or hypotonic (Hypo) condition during the indicated time period and fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences).

Immunocytochemistry was performed as described elsewhere³⁴. Detailed information about the antibodies used is provided in Supplementary Table 3. Nuclear counterstaining was performed with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The chambers were then removed and the slides were coverslipped. Fluorescent cells were observed with an Olympus BX61 (Scop Pro), and images were acquired at $\times 40$ magnification, with Q-Capture Pro 7, using a Retiga-2000R monochrome camera (Q Imaging).

Automated high-throughput microscopy (HTM). Cytoplasmic and nuclear fluorescence intensities were quantified by HTM, with an Arrayscan VTI microscope (ThermoFisher Scientific). The Molecular Translocation V4 Bioapplication (vHCS Scan, version 6.3.1) was used to calculate the ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence, as previously described⁵⁹. Briefly, nuclear and cytoplasmic masks were created (ring width = 35 and fixed threshold = 55) and the ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence within these masks was determined from the mean values obtained for >5000 cells per condition. The Target Activation Bioapplication was used to quantify HuR protein levels in KC3AC1 cells expressing Scr_ or HuR_shRNA (Fig. 9). A nuclear mask was created and the mean fluorescence intensity within this mask was determined from mean values obtained for >5000 cells.

Western blot analysis. Differentiated KC3AC1 cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 30 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1% Triton X-100, 1% protease inhibitors). The debris were removed by centrifugation and the resulting protein extracts were subjected to SDS-PAGE and processed for the multiplex detection of HuR or MR protein, together with α -tubulin or β -actin protein as a loading control, and. Signal fluorescence intensity was determined with an Odyssey[®] Fc (Li-Cor). Detailed information about the antibodies used is provided in Supplementary Table 3.

In vitro translation analysis. FL MR or $\Delta 6$ MR plasmids (1 μg) was translated *in vitro* with the TnT-T7 Quick Coupled Transcription/Translation kit (Promega) and the products of the reaction were analyzed by western blotting.

Investigations in mice. Animals were provided with free access to water, except for the water deprivation group, which did not receive any water for 18 h. Mice were subjected to either a high Na⁺ diet (Genestil) for two weeks or they received an i.p. injection of furosemide (40 mg/kg, Renaudin) over a period of 3 h. For water intoxication, animals were fed orally for 6 h with 3% vol/kg of body weight of a 10 mM glucose solution prepared with tap water (approximately 800 µl/mouse), *via* gavage feeding needles (Phymep). These mice simultaneously received an i.p. injection of dDAVP (Minirin, Ferring GmbH), at a concentration of 400 ng/kg body weight. Animals (*n*=6-7 per group) were euthanized and kidneys were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for subsequent analyses. Mice were bred in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The animal facility was approved (no. C94-043-12) by the French Ministry of Agriculture. All procedures were approved by the local ethics committee, CAP Sud (No. 2012-021).

Statistical analyses. The data are presented as the mean ± SEM. One-way ANOVA or Mann Whitney U-tests were used, as appropriate, to assess the significance of differences (Graphpad Prism software). A *P*-value of 0.05 was considered statistically significant: **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

Acknowledgments. This work was supported by grants from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, the *Université Paris-Sud* and *Agence Nationale de la Recherche* (Grant 11-BSV1-028-01). Ingrid Lema held a fellowship from the *Cardiovasculaire-Obésité-Rein-Diabète-Domaine d'Intérêt Majeur (Région Ile-de-France)* and HAC Pharma & SFE (*Société Française d'Endocrinologie*). The authors are indebted to Julie Sappa for english editing.

Author contributions. IL, AB, JF, NC, ML, and SV designed the study. IL, LA, KL, SV, NC, and ML performed the study. LA, IL, KL, AB, NC, ML, and SV analyzed the data and IL, LA, NC, ML, and SV wrote the paper.

Competing financial interests : The authors have no competing financial interests to declare.

References

1. Viengchareun, S. *et al.* The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl. Recept. Signal.* **5**, e012 (2007).
2. Canessa, C. M. *et al.* Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367**, 463–467 (1994).
3. Bhalla, V., Soundararajan, R., Pao, A. C., Li, H. & Pearce, D. Disinhibitory pathways for control of sodium transport: regulation of ENaC by SGK1 and GILZ. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291**, F714–721 (2006).
4. Verrey, F. Transcriptional control of sodium transport in tight epithelial by adrenal steroids. *J. Membr. Biol.* **144**, 93–110 (1995).
5. Quinkler, M. *et al.* Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria. *Circulation* **112**, 1435–1443 (2005).
6. Shibata, S. *et al.* Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat. Med.* **14**, 1370–1376 (2008).
7. Martinerie, L. *et al.* Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* **150**, 4414–4424 (2009).
8. Geller, D. S. *et al.* Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1: mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **17**, 1429–1436 (2006).
9. Zennaro, M. C., Le Menuet, D. & Lombès, M. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **10**, 1549–1560 (1996).
10. Le Menuet, D. *et al.* Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 7878–7886 (2000).
11. Pascual-Le Tallec, L., Demange, C. & Lombès, M. Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* **150**, 585–590 (2004).
12. Tallec, L. P.-L. *et al.* Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **17**, 2529–2542 (2003).
13. Shibata, S. *et al.* Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell Metab.* **18**, 660–671 (2013).

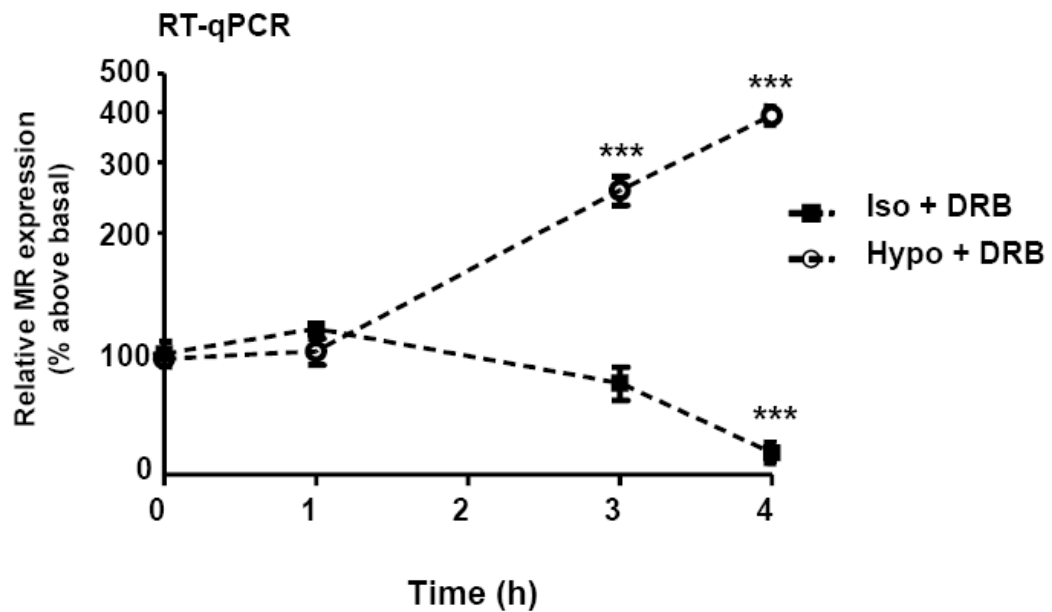
14. Faresse, N., Vitagliano, J.-J. & Staub, O. Differential ubiquitylation of the mineralocorticoid receptor is regulated by phosphorylation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 4373–4382 (2012).
15. Doucet, A. & Katz, A. I. Mineralocorticoid receptors along the nephron: [³H]aldosterone binding in rabbit tubules. *Am. J. Physiol.* **241**, F605–611 (1981).
16. Fenton, R. A. & Knepper, M. A. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol. Rev.* **87**, 1083–1112 (2007).
17. Viengchareun, S. *et al.* Osmotic stress regulates mineralocorticoid receptor expression in a novel aldosterone-sensitive cortical collecting duct cell line. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **23**, 1948–1962 (2009).
18. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. & Dreyfuss, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* **582**, 1977–1986 (2008).
19. Viengchareun, S. *et al.* Hypertonicity compromises renal mineralocorticoid receptor signaling through Tis11b-mediated post-transcriptional control. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **25**, 2213–2221 (2014).
20. Ma, W. J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A. & Furneaux, H. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 8144–8151 (1996).
21. Hinman, M. N. & Lou, H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **65**, 3168–3181 (2008).
22. Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H. H. & Gorospe, M. Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 1288–1292 (2007).
23. Katsanou, V. *et al.* The RNA-binding protein Elavl1/HuR is essential for placental branching morphogenesis and embryonic development. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2762–2776 (2009).
24. Lebedeva, S. *et al.* Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell* **43**, 340–352 (2011).
25. Mukherjee, N. *et al.* Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol. Cell* **43**, 327–339 (2011).
26. Lu, L. *et al.* Hu antigen R (HuR) is a positive regulator of the RNA-binding proteins TDP-43 and FUS/TLS: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **289**, 31792–31804 (2014).
27. Bloem, L. J., Guo, C. & Pratt, J. H. Identification of a splice variant of the rat and human mineralocorticoid receptor genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **55**, 159–162 (1995).
28. Wickert, L. *et al.* Differential mRNA expression of the two mineralocorticoid receptor splice variants within the human brain: structure analysis of their different DNA binding domains. *J. Neuroendocrinol.* **12**, 867–873 (2000).

29. Zhou, M. Y., Gomez-Sanchez, C. E. & Gomez-Sanchez, E. P. An alternatively spliced rat mineralocorticoid receptor mRNA causing truncation of the steroid binding domain. *Mol. Cell. Endocrinol.* **159**, 125–131 (2000).
30. Zennaro, M. C., Souque, A., Viengchareun, S., Poisson, E. & Lombès, M. A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **15**, 1586–1598 (2001).
31. Zhang, J. & Bowden, G. T. UVB irradiation regulates Cox-2 mRNA stability through AMPK and HuR in human keratinocytes. *Mol. Carcinog.* **47**, 974–983 (2008).
32. Doller, A., Pfeilschifter, J. & Eberhardt, W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell. Signal.* **20**, 2165–2173 (2008).
33. Chamboredon, S. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3366–3378 (2011).
34. Amazit, L. *et al.* Ligand-dependent degradation of SRC-1 is pivotal for progesterone receptor transcriptional activity. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **25**, 394–408 (2011).
35. López de Silanes, I., Zhan, M., Lal, A., Yang, X. & Gorospe, M. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2987–2992 (2004).
36. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).
37. Soler, D. M., Ghosh, A., Chen, F. & Shneider, B. L. A single element in the 3'UTR of the apical sodium-dependent bile acid transporter controls both stabilization and destabilization of mRNA. *Biochem. J.* **462**, 547–553 (2014).
38. Cherradi, N., Lejczak, C., Desroches-Castan, A. & Feige, J.-J. Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **20**, 916–930 (2006).
39. Komnenov, D. *et al.* Pro-inflammatory cytokines reduce human TAFI expression via tristetraprolin-mediated mRNA destabilisation and decreased binding of HuR. *Thromb. Haemost.* **114**, 337–349 (2015).
40. Zhu, H., Hasman, R. A., Young, K. M., Kedersha, N. L. & Lou, H. U1 snRNP-dependent function of TIAR in the regulation of alternative RNA processing of the human calcitonin/CGRP pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5959–5971 (2003).
41. Dutertre, M. *et al.* A recently evolved class of alternative 3'-terminal exons involved in cell cycle regulation by topoisomerase inhibitors. *Nat. Commun.* **5**, 3395 (2014).
42. Nishi, M., Ogawa, H., Ito, T., Matsuda, K. I. & Kawata, M. Dynamic changes in subcellular localization of mineralocorticoid receptor in living cells: in comparison with glucocorticoid

- receptor using dual-color labeling with green fluorescent protein spectral variants. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **15**, 1077–1092 (2001).
43. Fejes-Tóth, G., Pearce, D. & Náráy-Fejes-Tóth, A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2973–2978 (1998).
 44. Ge, J. *et al.* Essential Roles of RNA-binding Protein HuR in Activation of Hepatic Stellate Cells Induced by Transforming Growth Factor- β 1. *Sci. Rep.* **6**, 22141 (2016).
 45. Fan, X. C. & Steitz, J. A. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15293–15298 (1998).
 46. Doller, A. *et al.* Angiotensin II induces renal plasminogen activator inhibitor-1 and cyclooxygenase-2 expression post-transcriptionally via activation of the mRNA-stabilizing factor human-antigen R. *Am. J. Pathol.* **174**, 1252–1263 (2009).
 47. Levy, N. S., Chung, S., Furneaux, H. & Levy, A. P. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* **273**, 6417–6423 (1998).
 48. Mochizuki, H., Murphy, C. J., Brandt, J. D., Kiuchi, Y. & Russell, P. Altered stability of mRNAs associated with glaucoma progression in human trabecular meshwork cells following oxidative stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 1734–1741 (2012).
 49. St Laurent, G. *et al.* Insights from the HuR-interacting transcriptome: ncRNAs, ubiquitin pathways, and patterns of secondary structure dependent RNA interactions. *Mol. Genet. Genomics MGG* **287**, 867–879 (2012).
 50. Barker, A. *et al.* Sequence requirements for RNA binding by HuR and AUF1. *J. Biochem. (Tokyo)* **151**, 423–437 (2012).
 51. Srikantan, S., Tominaga, K. & Gorospe, M. Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 372–379 (2012).
 52. He, F. *et al.* MiR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1. *Diabetologia* **57**, 1726–1736 (2014).
 53. Beltrami, C., Clayton, A., Phillips, A. O., Fraser, D. J. & Bowen, T. Analysis of urinary microRNAs in chronic kidney disease. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 875–879 (2012).
 54. Chang, S.-H. *et al.* ELAVL1 regulates alternative splicing of eIF4E transporter to promote postnatal angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 18309–18314 (2014).
 55. Izquierdo, J. M. Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. *J. Biol. Chem.* **283**, 19077–19084 (2008).
 56. van der Vaart, M. & Schaaf, M. J. M. Naturally occurring C-terminal splice variants of nuclear receptors. *Nucl. Recept. Signal.* **7**, e007 (2009).

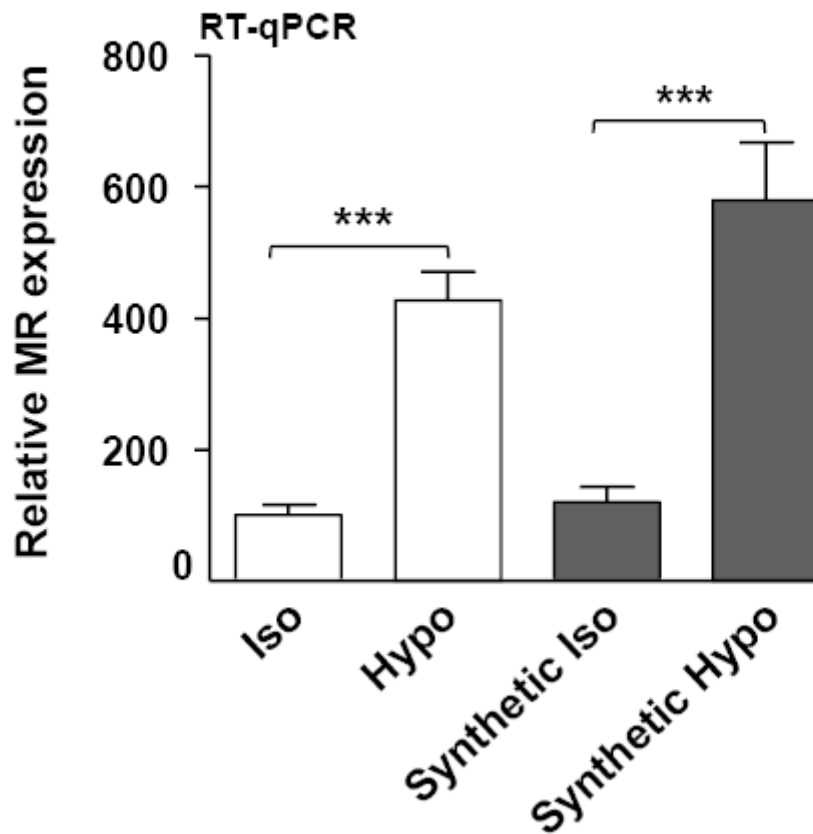
57. Leung, D. Y. *et al.* Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J. Exp. Med.* **186**, 1567–1574 (1997).
58. Le Billan, F. *et al.* Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **29**, 3977–3989 (2015).
59. Amazit, L. *et al.* Finerenone Impedes Aldosterone-dependent Nuclear Import of the Mineralocorticoid Receptor and Prevents Genomic Recruitment of Steroid Receptor Coactivator-1. *J. Biol. Chem.* **290**, 21876–21889 (2015).

MR mRNA

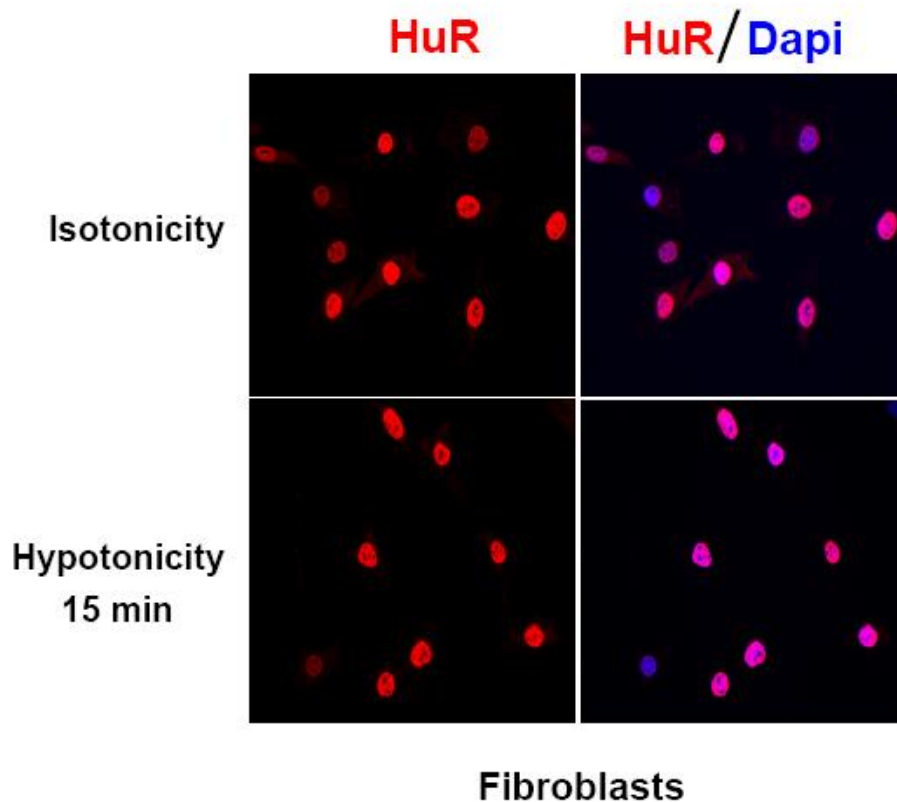


Supplementary Figure 1. Hypotonicity increases MR expression through posttranscriptional mechanisms. KC3AC1 cells were incubated for 1 to 4 h under isotonic or hypotonic conditions, in the presence of $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ DRB (Sigma), except at time t_0 , when cells were not subjected to the effects of DRB action. MR transcript levels were analyzed by RT-qPCR and normalized relative to *36b4* mRNA. MR mRNA levels, at time t_0 , are arbitrary set at 100%. Note the logarithmic scale of the y-axis (relative MR expression, % above basal). The data shown are the mean \pm SEM of one representative experiment ($n = 8$). *** $p < 0.001$; (Mann-Whitney U-test).

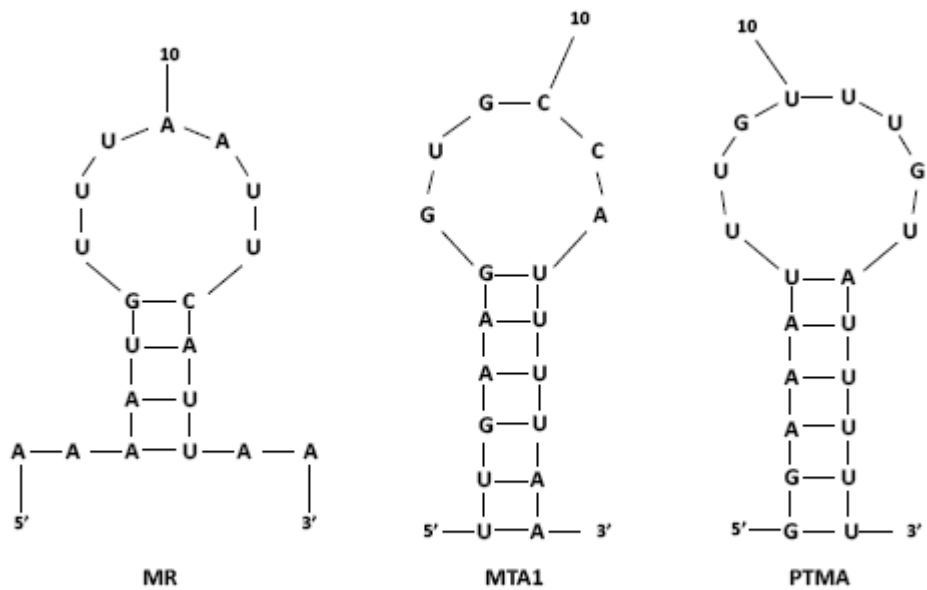
MR mRNA



Supplementary Figure 2. Hypotonicity is responsible for the increase in MR transcript level. In all experiments, the hypotonic medium ($150 \text{ mOsmol l}^{-1}$) was generated by diluting the culture medium two-fold with sterile wwater. We ruled out an effect of changes in glucose concentration by comparing the effects on MR expression of normal isotonic (Iso) and hypotonic (Hypo) media with those of synthetic isotonic (120 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) and hypotonic (60 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) media. KC3AC1 cells were cultured in isotonic and hypotonic media for 6 h and MR expression was then analyzed by RT-qPCR. The data shown are the means \pm SEM of two independent experiments ($n=12-16$). *** $p < 0.001$; NS= not significant (Mann-Whitney U-test).

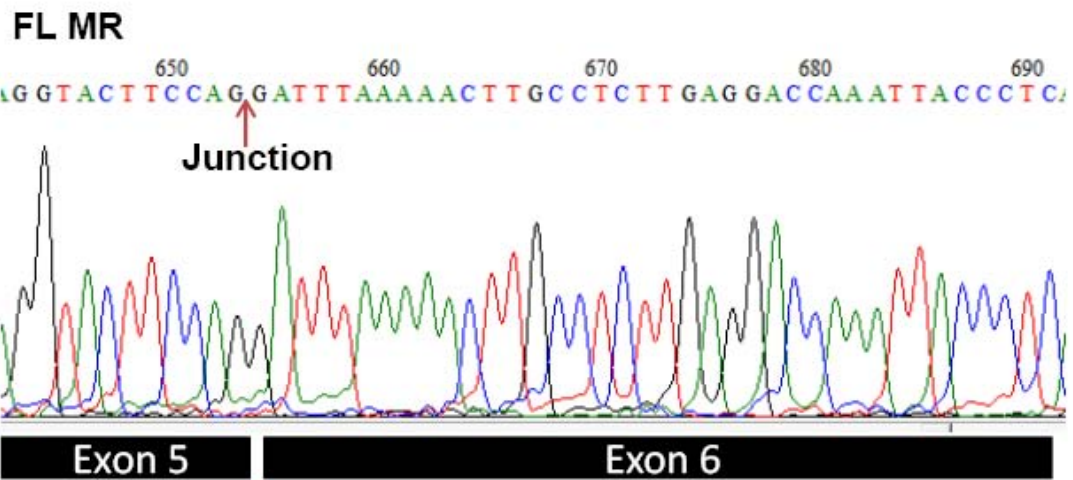


Supplementary Figure 3. Hypotonicity does not modulate HuR trafficking in fibroblasts. Primary cultures of human dermal fibroblasts in isotonic medium were prepared, and the cells were then incubated under hypotonic medium for 15 min. Immunocytochemistry for HuR was performed as described in the methods section, with the 3A2 anti-HuR antibody. The nuclei were stained with DAPI (blue). HuR staining was mostly nuclear in isotonic and hypotonic conditions, suggesting that HuR trafficking in human fibroblasts was not modified by hypotonicity. Bar=25 μ m. This experiment was performed in duplicate.

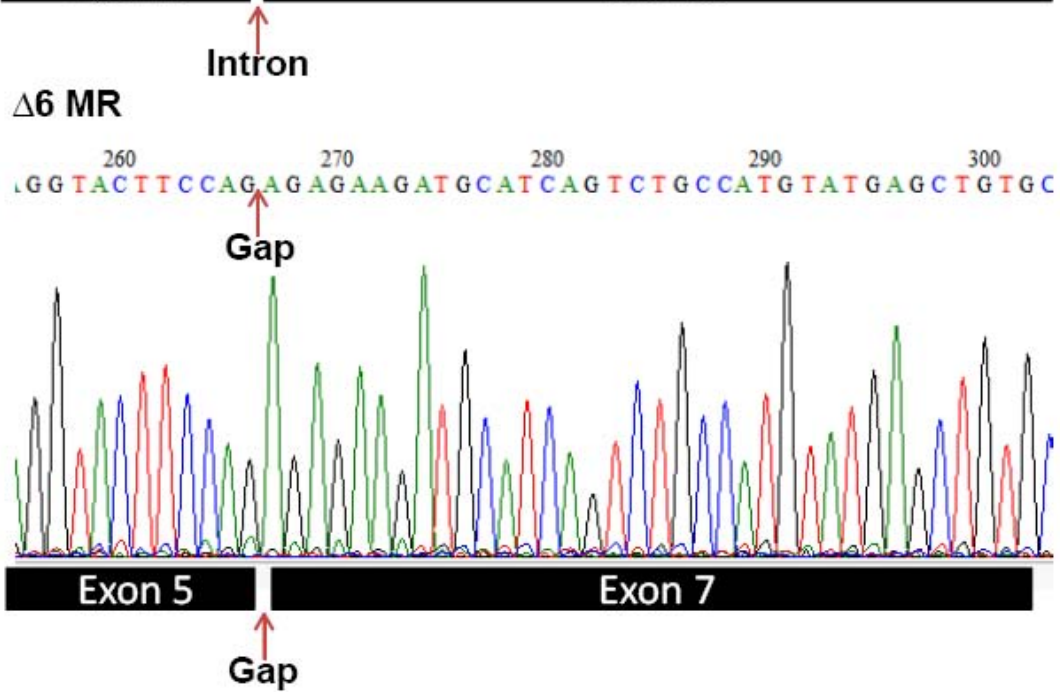


Supplementary Figure 4. Examples of RNA secondary structures targeted by HuR. The mFold web server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) generate the hairpin secondary structure of the MR 3'-UTR (left panel). Such a secondary structure has already been described for MTA (metastasis-associate 1) and the PTMA (prothymosin) 3'-UTR (right panels) and has been shown to interact physically with HuR³⁵.

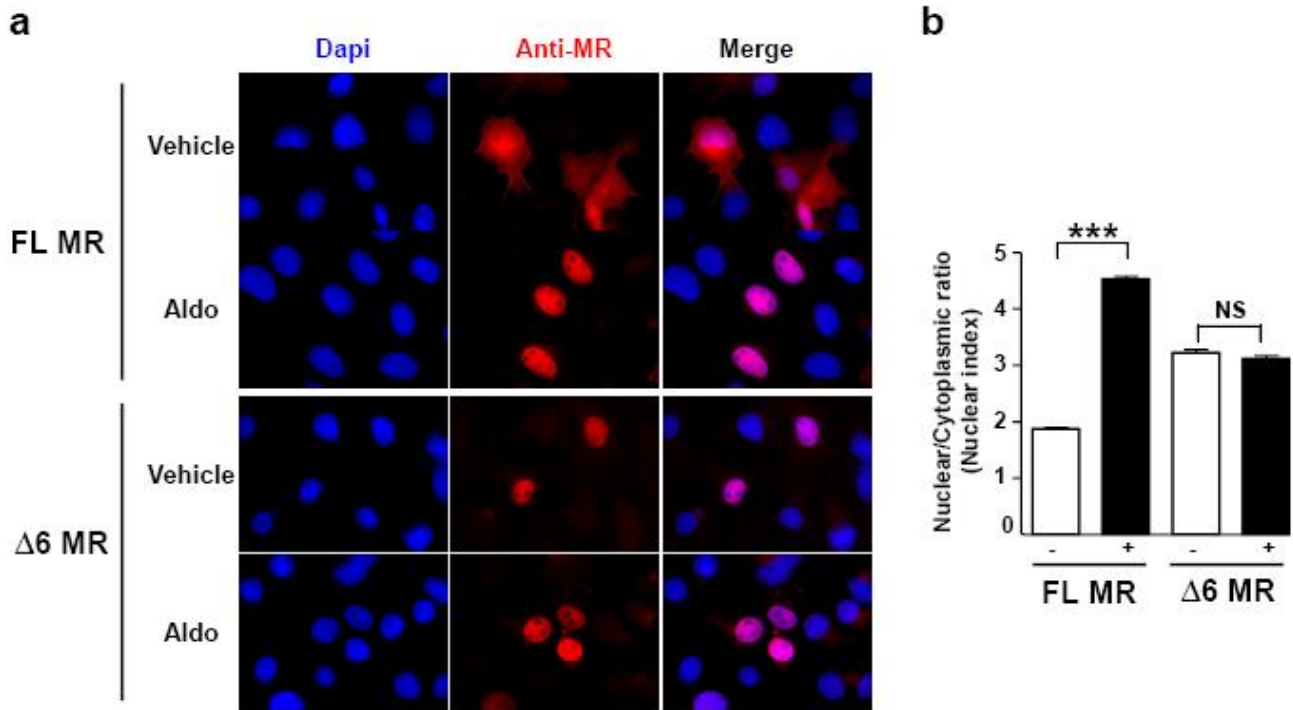
a



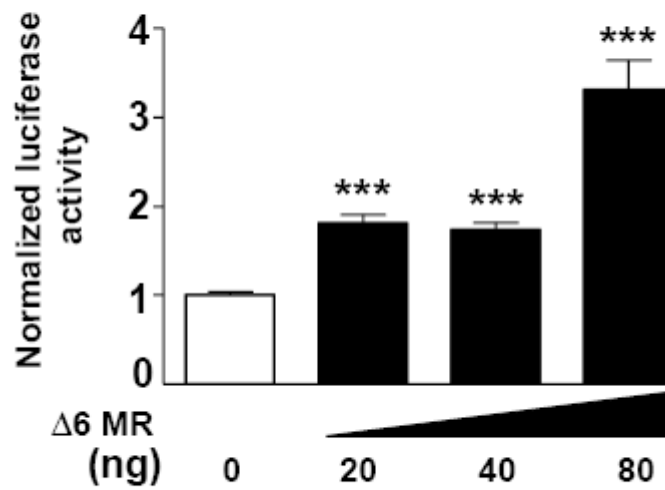
b



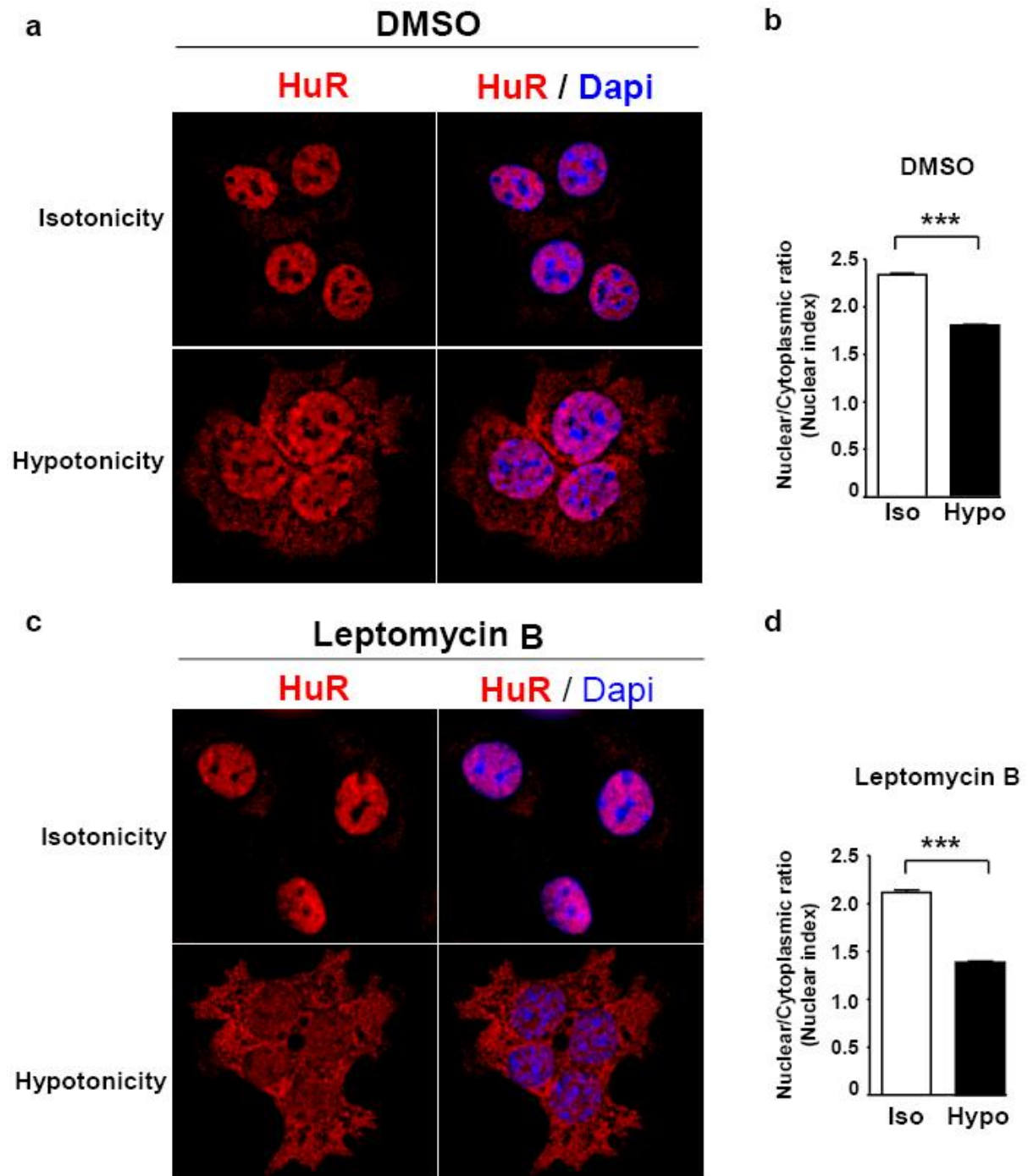
Supplementary Figure 5. Sequencing of the FL and $\Delta 6$ MR transcripts. Murine FL MR and $\Delta 6$ MR were amplified by RT-PCR from differentiated KC3AC1 cells and inserted into the pGEMT-easy vector. Chromatograms of FL MR (a) and $\Delta 6$ MR (b) revealed that the $\Delta 6$ MR variant entirely lacked exon 6 of *Nr3c2* gene.



Supplementary Figure 6. Cellular trafficking of the $\Delta 6$ MR splice variant. (a) COS 7 cells were transfected as described in the methods section, with FL MR- or $\Delta 6$ MR-encoding plasmids, and were then incubated for 1 h with ethanol (vehicle) or 10 nM aldosterone (Aldo). Cells were fixed and processed for MR immunodetection with the 39N anti-MR antibody. Representative images of the subcellular localization of MR FL and MR $\Delta 6$ before and after hormone treatment. After aldosterone stimulation, FL MR was translocated to the nucleus, whereas $\Delta 6$ MR was already present in the nucleus, even in the absence of the ligand. The nuclei were stained with DAPI (blue). (b) HuR immunodetection was coupled with an automated high-throughput microscopy (HTM) analysis, to quantify the subcellular trafficking of this protein. The results are expressed as the mean ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence \pm SEM ($n > 800$ cells). Bar, 25 μ m. *** $p < 0.001$; NS=not significant (Mann-Whitney U-test).



Supplementary Figure 7. The $\Delta 6$ MR splice variant is a ligand-independent transactivator. HEK 293T cells were transfected with various amounts of the plasmid encoding $\Delta 6$ MR (20 to 80 ng), as described above (legend to Fig. 6). The following day, luciferase activities were measured and normalized relative to β -galactosidase activities. The data shown are the mean \pm SEM of two independent experiments ($n=24$). *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney U-test).



Supplementary Figure 8. The rapid hypotonicity-induced nuclear export of HuR is a CRM1-independent phenomenon. KC3AC1 cells were incubated for 1 h in complete medium containing either (a) DMSO (vehicle) or (b) 20 nM leptomycin B (Sigma, St. Louis, USA). The cells were then incubated, under the same conditions, with isotonic or hypotonic medium, for 15 min. Immunocytochemistry was performed with an anti-HuR antibody and observation by deconvolution microscopy (see methods section). The nuclei were stained with DAPI. The subcellular distribution of HuR was analyzed by HTM quantification. Results are presented as the nuclear-to-cytoplasmic index, reflecting the ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence ($n > 2500$ cells, error bars indicate the SEM). *** $p < 0.001$; (Mann-Whitney U-test).

Name	Motifs					References	
Pentamer	^u _A UUUA	^u _c UUUA	AUUU ^u _c	UUUUU		1	
Hexamer AU-Rich	UUUAUU	AUAUUU	AAUUUU	ACUUUU	UUAAAA	UUUAAU	2
Hexamer HuR Specific	UUUUUU	UUUUCU	UUUCUU	UUUUUC	UUCUUU	UCUUUU	2
Heptamer HuR Known	UUUUUUU	UUUAUUU	UUUGUUU				3
AU-Rich	UAUUUAU	AUUUUUA	AUUUAUU	AAUUUUA	AAUAUUU		3
Polypyrimidine tract motifs	UUUCUUU	UUUUUUC	UUUCCUU	UCUCUUU			3

1. Mukherjee, N. *et al.* Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol. Cell* **43**, 327–339 (2011).
2. Mukherjee, N. *et al.* Global target mRNA specification and regulation by the RNA-binding protein ZFP36. *Genome Biol.* **15**, R12 (2014).
3. Lebedeva, S. *et al.* Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell* **43**, 340–352 (2011).

Supplementary Table 1. Overview of previously described target RNA motifs for HuR binding. An exhaustive list of primary RNA motifs identified in previous studies is presented^{24, 25}. These motifs were identified by integrating data from several high-throughput targeting technologies, such as PAR-CLIP, RIP-ChIP, and whole-transcript expression profiling.

Name	Forward primer	Reverse primer
mutR3	CCATACATTGCATCAGTGCCAAGCAAACAGATTAATGAATTAACATTT	AAATGTTTAATTCATTAATCTGTTTGCTTGGCACTGATGCAATGTATGG

Primer sequences used in DNA-ChIP

Name	Forward primer	Reverse primer
Sgk1	AGAAGGTTGAGACAAGAAGA	AACCCCTTACTGTTGAGCTA
UCP1	GGACACTAGGTAAGTGAA	GAAGAGCAGAAATCAGACTC

Primer sequences used in RNP-IP

Name	Amplicon size (bp)	Forward primer	Reverse primer
mMR	799	GGAAGTTTTAACTATGCCATGTGGTT	CAGAACTACGCGCTGGAGTCT
Luciferase	202	CCGGTAAGACCTTTCGGTAC	ACCCCAACATCTTCGACGC
R1	509	AACGCCCTTGAGATGGAAG	ACTGGGACGAAGACGAACAC
R2	519	GGTATACACACTCGTTAGCGTCCAT	AAGCGGGAGACCAAGAACAA
R3	489	CATGTGGGAGAGGAGGTCCTT	CATACATTGCATCAGTGCCAAA
R4	658	GGCAACATTACCTTGTCTTCA	TTGCTCCAAAACAACAGGTGAT
HPRT	308	GCCATCACCATTGTAGCCCTCT	TGCGACCTTGACCATCTTTGG

Primer sequences used in RT-qPCR

Name	Accession number	Amplicon size (bp)	Forward primer	Reverse primer
MR (<i>Nr3c2</i>)	M36074	153	ATGGAAACCACACGGTGACCT	AGCCTCATCTCCACACACCAAG
18S	X00686	66	CCCTGCCCTTGTACACACC	CGATCCGAGGGCCTCACTA
36b4 (<i>Rplp0</i>)	NM_007475.5	128	AGCGCGTCTGGCATTGTCTGT	GGGCAGCAGTGGTGGCAGCAGG
HPRT	164518913	80	ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT	TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG

Oligonucleotide sequences of forward (f) and reverse (r) primers and Taqman probes (p)

cDNA	Accession number	Primer	Sequence (5'-3')
FL MR	NM_001083906.1	f	TCGTTTGCCTTGAGTTGGAGAT
		r	TGCATCAGTCTGCCATGTATGA
		p	TACAAACATACGAACAGCC
Δ6 MR	NM_001083906.1	f	CAGATGATCCAAGTCGTGAAGTG
		r	GTATGAGCTGTCCAGGGGA
		p	TACTTCCAGAGAGAAGATG
18s	NR_003278.3	f	TAGAGGGACAAGTGGCGTTCA
		r	TGTGATGCCCTTAGATGTCCG
		p	ACCGGAGATTGAGCAAT
Gapdh	NM_008084.3	f r / p	Unknown (provided by ThermoFisher Scientific) Mm99999915_g1

Supplementary Table 2

All primer sequences are shown 5' to 3'.

Primer sequences used for site-directed mutagenesis to generate the mutR3 mutant

Antibodies for western blot analysis

<i>Name (Provider)</i>	<i>Species</i>	<i>Protein</i>	<i>Molecular weight (kDa)</i>	<i>Dilution</i>
Primary Antibodies				
39N	Rabbit	MR	130 kDa	1:1000 or 1:5000 (tissues)
α -tubulin (Sigma)	Mouse	α -tubulin	50 kDa	1:10000
3A2 (Santa Cruz)	Mouse	HuR	36 kDa	1:500
Secondary Antibodies				
Dylight Anti-Rabbit 800 (Fisher Scientific)	Goat	Rabbit IgG		1:15000
Dylight Anti-Mouse 680 (Fisher Scientific)	Rabbit	Mouse IgG		1:15000
Dylight Anti-Rabbit 680 (Fisher Scientific)	Goat	Rabbit IgG		1:15000
Dylight Anti-Mouse 800 (Fisher Scientific)	Rabbit	Mouse IgG		1:15000

NB: TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20), Blocking Buffer (Li-Cor)

Antibodies for immunohistochemistry

<i>Name (Provider)</i>	<i>Species</i>	<i>Protein</i>	<i>Dilution</i>
Primary Antibodies			
3A2 (Santa Cruz)	Mouse	HuR	1: 500
Secondary Antibodies			
Alexa 555 Anti-Mouse (Life Technologies)	Goat	Mouse IgG	1:15000

2. Données supplémentaires et autres éléments de discussion

Dans ce travail, nous avons formellement démontré, grâce à une stratégie de siRNA interférence, que la protéine de liaison à l'ARN HuR est impliquée dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR en réponse à un stress hypotonique. Nous avons ensuite montré que l'hypotonie induit un export rapide et transitoire de HuR vers le cytoplasme où elle interagit avec la région 3'UTR du transcrite MR, au niveau de la région R3, sur un motif essentiel formant une structure en « épingle à cheveux ». Ainsi, la stabilité du transcrite MR est augmentée ainsi que l'expression de la protéine MR dans les cellules tubulaires rénales.

Fonctions antagonistes entre Tis11b et HuR et implication possible d'autres régulateurs post-transcriptionnels dans le contrôle de l'expression du MR

Nous avons envisagé la possibilité que les protéines de liaison à l'ARN Tis11b et HuR puissent exercer des fonctions antagonistes sur le transcrite MR car elles interagissent toutes les deux sur ce même transcrite (voir 1^{ère} et 2^e partie des Résultats) et parce que cela a déjà été rapporté pour le contrôle post-transcriptionnel du transcrite VEGF en réponse à l'ACTH, par exemple (Cherradi *et al.* 2006). Pour tester cette hypothèse, nous avons généré une construction plasmidique, dans laquelle la région R2-3 de la région 3'UTR du transcrite MR, a été placée en aval du gène rapporteur de la luciférase. Cette région R2-3 possède les deux motifs ARE₃ et ARE₄ essentiels à l'action déstabilisatrice de Tis11b ainsi que le motif en « épingle à cheveux », qui est crucial pour l'action de HuR.

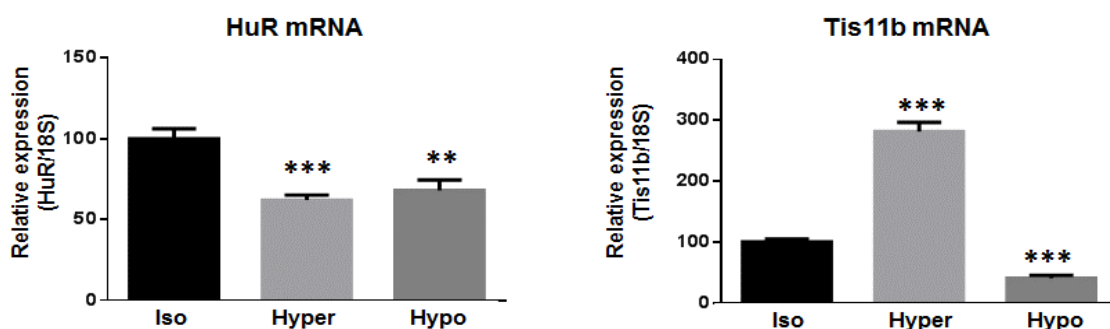


Figure 30 : Analyse de l'expression des transcrits HuR et Tis11b dans les cellules KC3AC1 en réponse au stress osmotique.

Les cellules ont été soumises à un stress hypertonique (hyper) ou hypotonique (hypo) pendant 6 h puis les ARN ont été extraits et rétro-transcrits. L'expression de HuR, de Tis 11b et du 18s ont été quantifiées par RT-qPCR. Les résultats représentent l'expression relative de HuR et de Tis11 b, normalisées à celle du 18S, et exprimée en fonction de celle mesurée en condition isotonique (arbitrairement fixée à 100%). Les résultats présentent la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne de 8 échantillons par condition. Test statistique : Mann Whitney NS : non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ainsi, nous avons pu démontrer que l'action stabilisatrice de HuR n'empêche pas l'action déstabilisatrice de Tis11b. Ces résultats indiquent aussi que l'action d'une RBP sur un transcrite donné peut être synergique ou complémentée par l'action d'une autre RBP en fonction du stimulus.

La Figure 30 présente des données de quantification par RT-qPCR de l'expression de Tis11b et de HuR dans les cellules rénales KC3AC1 en fonction du stress osmotique. Les résultats révèlent une baisse d'environ 20% des transcrits HuR quelle que soit la condition testée. Au contraire, l'expression de Tis11b, qui est clairement augmentée en réponse à un stress hypertonique, diminue d'un facteur 2 lorsque les cellules sont cultivées en condition hypotonique. Ces résultats soulignent la complexité des mécanismes post-transcriptionnels, en partie due à un grand nombre d'acteurs pouvant intervenir à ce niveau de régulation. En effet, l'expression de Tis11b et HuR peuvent être régulées par d'autres protéines de liaison à l'ARN mais aussi par des miARN, qui sont également des régulateurs post-transcriptionnels, comme cela a déjà été rapporté (Mittal *et al.* 2011; Srikantan *et al.* 2012). Tous ces acteurs de la régulation post-transcriptionnelle peuvent aussi s'auto-réguler et il reste indispensable d'évaluer également le niveau de protéines correspondantes afin d'avoir une vision plus détaillée de la complexité des mécanismes post-transcriptionnels intriqués.

Le rôle exact des autres membres de la famille TIS11 tels que TTP et Tis11d, qui sont exprimés dans les cellules KC3AC1, n'est pas bien connu mais ces derniers pourraient aussi participer au contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR. Nous avons par ailleurs des résultats préliminaires (voir 3^e Partie des Résultats), qui suggèrent que les miARN constituent d'importants régulateurs post-transcriptionnels de l'expression du MR. Il serait donc intéressant de quantifier l'expression de ces différentes RBP et de ces miARN pour tenter d'établir une corrélation entre leur niveau d'expression et les résultats que nous avons obtenus.

Pertinence physiopathologique de ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle

Afin de déterminer la pertinence physiopathologique de ce mécanisme de régulation, nous avons analysé l'expression de *Sgk1*, un gène cible du MR, dans les cellules KC3AC1 cultivées sur filtre et soumises à un stress hypotonique appliqué sur la membrane apicale. Ainsi, nous avons pu montrer que l'hypotonicité augmente le recrutement du MR sur le promoteur du gène *sgk1* et potentialise l'effet de l'aldostérone sur l'induction de l'expression de cette kinase. Ces résultats sont essentiels car ils démontrent que l'hypotonicité permet d'amplifier la signalisation minéralocorticoïde, favorisant probablement une meilleure réabsorption de sodium.

Il nous semblait important d'établir si ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle étaient également mis en œuvre *in vivo*. Dans ce contexte, et pour valider l'hypothèse selon laquelle une hypotonie extracellulaire serait susceptible d'augmenter l'expression du MR dans les cellules sensibles aux minéralocorticoïdes du tubule rénal et donc *in fine* la réponse à l'aldostérone, il était indispensable d'étudier la réponse rénale en terme de bilan hydro-électrolytique induit par l'aldostérone. Nous avons donc réalisé des expériences sur des souris soumises pendant 2 semaines à un régime riche en sodium (3%) dans le but de diminuer les taux plasmatiques d'aldostérone afin de se affranchir d'une surrénalectomie. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé ou pas un gavage hydrique de ces animaux afin d'amplifier la diurèse, situation sensée, au moins en partie, mimer une relative hypotonie dans les segments néphroniques, comme nous l'avions réalisé précédemment (Lema *et al.* 2014) et selon le schéma présenté en Figure 3. Les animaux ont également été traités par l'aldostérone (injection intrapéritonéal).

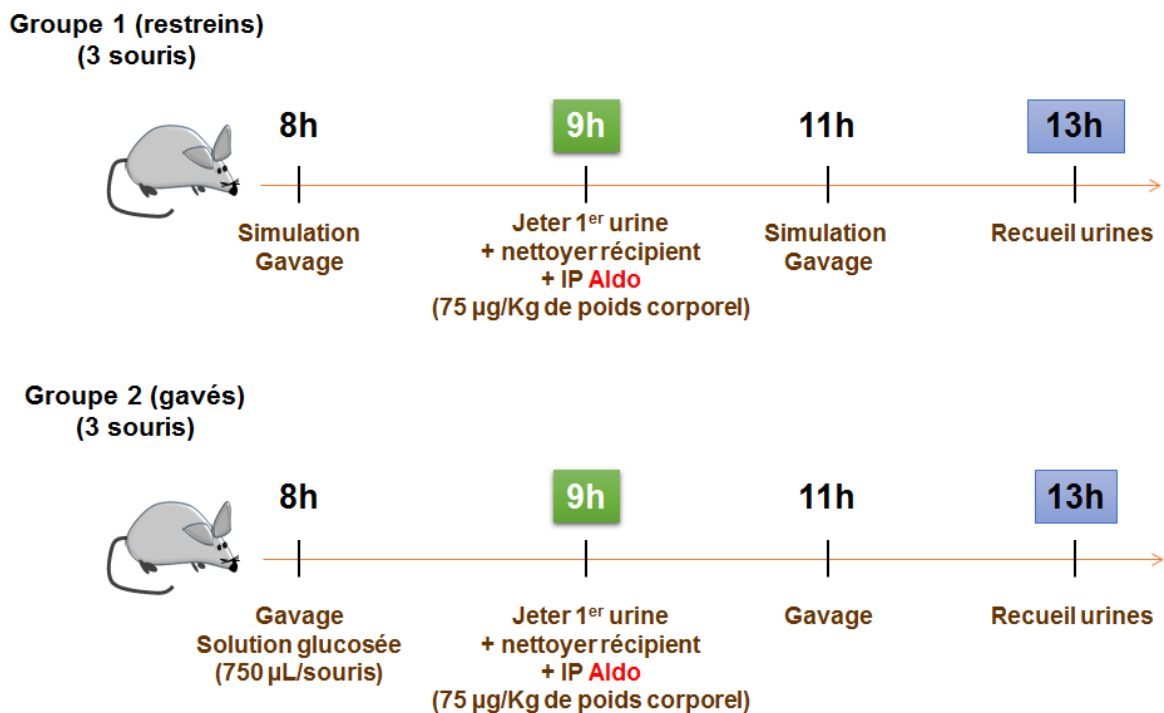


Figure 31 : Stratégie utilisée pour l'analyse *in vivo* des effets d'une hypertonicité extracellulaire relative sur la réabsorption de sodium stimulée par l'aldostérone et sur l'expression rénale du MR.

Deux groupes de souris Swiss mâle âgées de 6 semaines, ont été mis sous régime riche en sel (3%) pendant 10 jours avant la réalisation de l'expérimentation. Une simulation de gavage hydrique a été effectuée sur les souris contrôles. Les souris du groupe 2 ont reçu par gavage 750 µL d'une solution glucosée (10 mM). Les premières urines (9 h) sont éliminées pour l'ensemble des animaux et l'aldostérone (15 µg/kg de poids corporel) est injectée aux animaux en intrapéritonéal. Les urines sont recueillies à la fin de l'expérience avant sacrifice des animaux. Durant les temps de l'expérimentation les souris n'ont pas accès à l'eau et à leur alimentation.

Ces expériences ont été réalisées sur la Plateforme d'Hébergement et d'Expérimentation Animale du Centre de Recherche de Saint Antoine. Les résultats présentés sur la Figure 32, révèlent, comme attendu, un doublement de la diurèse associé à une baisse significative de l'osmolarité urinaire chez les souris gavées par rapport aux souris contrôles. Après injection de aldostérone, nous constatons également une diminution du rapport Na^+/K^+ ce qui atteste d'une amplification de la réponse à aldostérone chez ces animaux dans lesquels une diurèse a été exacerbée. En effet, les animaux gavés réabsorbent plus de sodium (baisse de la concentration Na^+ urinaire et de la natriurèse) et sécrètent plus de potassium (élévation de la concentration de potassium urinaire et augmentation de la kaliurèse) par comparaison au groupe de souris restreintes. Ces expériences préliminaires nous ont encouragés à reproduire ces résultats prometteurs, en intégrant, cette fois, des groupes contrôles supplémentaires (restreints et gavés) ne recevant pas de aldostérone afin de pouvoir comparer la réponse spécifique à aldostérone et l'effet propre de l'hypotonie sur la réabsorption de sodium vérifiant ainsi *in vivo* les conséquences d'une augmentation de l'expression du MR sur la fonction rénale. La première expérience pilote ne comportant pas les groupes contrôles correspondants.

La réalisation de ces nouvelles expériences nous a permis de confirmer la baisse de l'osmolarité urinaire chez les souris gavées sans atteindre toutefois des osmolarités inférieures à l'osmolarité plasmatique (>300 mOsm/L) mais malheureusement nous n'avons pas été en mesure de démontrer de manière claire une meilleure réponse à aldostérone sur la réabsorption de sodium ni chez les souris gavées ni restreintes. A notre plus grand étonnement, lors de ces nouvelles séries d'expériences, une inversion (augmentation) des rapports Na^+/K^+ entre les groupes gavés et restreints a même été constatée après traitement par aldostérone, en contradiction totale avec toutes les données de la littérature sur la diminution du rapport Na^+/K^+ (test historique de Kagawa, par exemple). Il est également important de préciser que ces expériences n'ont pas été réalisées directement par notre équipe, dans la mesure où nous ne disposions pas de cages métaboliques adaptées. Nous ne sommes donc pas à l'abri d'erreurs de manipulations expérimentales humaines possibles. Il est également possible que le protocole d'investigation entrepris ne soit pas parfaitement approprié. Tous ces problèmes expérimentaux ont rendu difficile la confirmation des résultats préliminaires et c'est la raison pour laquelle nous ne les avons pas inclus dans le corps du manuscrit soumis. Cette investigation chez l'animal devra vraisemblablement être reprogrammée avec un protocole modifié afin d'en améliorer les résultats.

D'une manière générale, le gavage hydrique des souris permet d'augmenter le volume urinaire mais également d'en réduire l'osmolarité urinaire, mais l'osmolarité moyenne (~ 400 mOsm/L) des souris gavées reste relativement élevée par comparaison au plasma

(300 mOsmol/L). Ceci peut s'expliquer, en partie, par les quantités élevées de sel ingéré par les animaux qui malgré la stimulation de la réabsorption de Na⁺ induite par l'aldostérone ne seraient pas en mesure de diminuer davantage leur natriurèse. Par ailleurs, nous n'avons pas non plus contrôlé le degré de répression du système SRAA : les concentrations plasmatiques d'aldostérone non mesurées dans cette étude, pourraient ne pas être effondrées ce qui pourrait ainsi limiter la réponse antinatriurétique et kaliurétique de l'aldostérone injectée. Il serait peut-être plus pertinent de travailler sur des animaux surrénalectomisés afin de réduire de manière plus drastique l'aldostérone circulante et d'obtenir des urines plus hypotoniques.

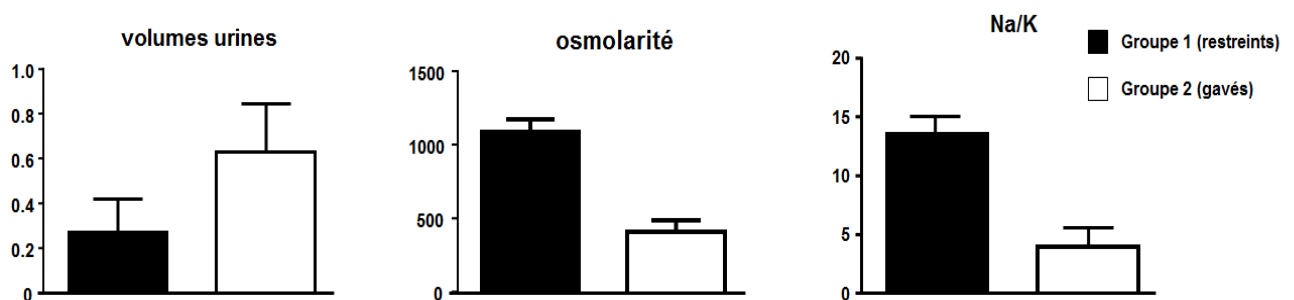


Figure 32 : Effet de la modulation de la diurèse sur la réabsorption sodée chez la souris.

Les souris sont traitées selon le plan expérimental présenté à la figure 30. Sur les urines recueillies, le volume, l'osmolarité ainsi que les concentrations en sodium et potassium ont été mesurées. N=3 animaux par condition.

Implication de HuR dans l'édition de nouveaux variants de épissage du transcrit MR

La protéine HuR exerce à l'évidence son rôle de protéine stabilisatrice de transcrits dans le compartiment cytoplasmique en réponse à de nombreux stimuli (hypoxie, déplétion énergétique, etc.) (Ma *et al.* 1996; Doller *et al.* 2008; Hinman & Lou 2008). Cependant, on sait depuis longtemps que la protéine HuR est aussi exprimée dans le noyau sans que l'on connaisse avec certitude son rôle.

La première démonstration du rôle nucléaire de HuR a été faite par les travaux de Zhu *et al.*, qui ont rapporté une action de HuR dans l'épissage alternatif du pré-ARNm CGRP (Zhu *et al.* 2006). Depuis, il a été démontré que HuR agit dans le noyau, au niveau des régions introniques des pré-ARNm, comme un facteur d'épissage alternatif (Lebedeva *et al.* 2011; Mukherjee *et al.* 2011). Les travaux de Zhao *et al.* ont, par ailleurs, démontré le rôle de HuR dans la régulation de l'épissage alternatif du pré-ARNm de SIRT1, une protéine impliquée dans de nombreux processus biologiques (métabolisme, sénescence, réponse au stress, etc.) (Zhao *et al.* 2014). HuR agit enfin sur le transcrit mature de SIRT1, en se fixant sur sa région 3'UTR, pour stabiliser le transcrit et augmenter son expression (Abdelmohsen *et al.* 2007).

Plusieurs données de la littérature ont permis de démontrer un rôle crucial de HuR dans la promotion de saut d'exons de ses pré-ARNm cibles en empêchant notamment l'association des snRNP U2AF65 avec les sites 3'S, prévenant ainsi la définition des exons et leur reconnaissance par le spliceosome (Izquierdo 2008). Mais, l'identification d'une autre RBP, telle que TIA-1/TIAL1, qui favorise l'inclusion d'exons, démontre la complexité d'un système de régulation de l'épissage alternatif se mettant en place précisément en réponse à des conditions de stress spécifiques (Izquierdo 2008, 2010).

Par ailleurs, les travaux de Zhao *et al.*, ont démontré la compétition et la dualité des actions de HuR et de TIA-1/TIAL1 sur le même transcrite SIRT1, au niveau des mêmes régions U-riches. Ces RBP possèdent également des structures proches avec 3 domaines RRM (Zhao *et al.* 2014). Cet exemple, loin d'être isolé, souligne le possible rôle de autres RBP, qui favorisent notamment l'expression du transcrite FL MR (Full Length MR).

La protéine TIA-1/TIAL1 a été décrite comme étant majoritairement exprimée dans le cerveau, le testicule et la rate (Beck *et al.* 1996). Plus récemment, son expression a été étendue à de nombreux tissus tels que le rein, le muscle squelettique, le poumon ou encore le foie (Izquierdo & Valcárcel 2007). Dans ce même travail, une détection des isoformes de TIA-1 mais également de TIAR (TIA-1 Related Protein), une RBP appartenant à la même famille que TIA-1, démontre un patron d'expression qui diffère en fonction des tissus mais il est intéressant de noter que les isoformes présentent des activités de facteur d'épissage alternatif différentes. Au final, ces deux RBP (TIA-1 et TIAR) sont capables d'agir sur l'épissage alternatif de l'autre pour générer ses isoformes (Le Guiner *et al.* 2001). TIA-1 apparait comme le facteur d'épissage antagoniste à l'action de HuR pour de nombreux pré-ARNm communs. Il serait donc pertinent, dans ce contexte, d'étudier son expression dans les cellules rénales KC3AC1 et les autres tissus cibles du MR et son rôle potentiel sur le pré-messager du MR afin de préciser un peu plus le mécanisme. Dans la mesure où cette RBP est exportée vers le cytoplasme en réponse à un stress (Zhang *et al.* 2005), on pourrait imaginer que les variations de tonicité extracellulaire puissent aussi moduler sa localisation subcellulaire et sa fonction.

L'ensemble de ces données suggérait donc que HuR puisse également jouer un rôle dans l'édition de variants d'épissage pour le transcrite MR d'autant plus que de nombreux variants de ce transcrite avaient déjà été décrits dans le passé, sans qu'aucun mécanisme sous-jacent n'ait été caractérisé (Bloem *et al.* 1995; Wickert *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2000; Zennaro *et al.* 2001).

En utilisant des ADNc de cellules rénales KC3AC1, nous avons été en mesure de cloner deux variants d'épissage du transcrite MR de souris : les variants 6 MR et 5,6 MR. La

caractérisation approfondie du nouveau variant $\Delta 6$ MR est présentée dans la publication de cette 2^e partie des Résultats. S'agissant du variant $\Delta 5,6$ MR, le saut des exons 5 et 6 conduit à l'apparition d'un codon stop, qui aboutit à une protéine tronquée ne possédant plus de LBD mais une courte extrémité C-terminale de 27 acides aminés. Contrairement au variant $\Delta 6$ MR, ce dernier ne possède plus sa région charnière (Figure 33, 33b et 33c).

L'étude de la fonctionnalité de ces variants a révélé une activité transcriptionnelle basale plus forte par rapport à celle du MR sauvage (FL MR) et une activité transactivatrice indépendante de la présence du ligand (Figure 33d et 33e). Il est intéressant de noter, qu'à l'opposé du variant $\Delta 6$ MR, qui exerce un effet dominant négatif sur l'activité du MR sauvage, le variant $\Delta 5,6$ MR augmente l'activité du FL MR lorsqu'il est surexprimé par rapport à ce dernier (ratio 2:1 ; Figure 33f). Les résultats présentés dans la Figure 33 sont en accord avec la localisation majoritairement nucléaire de ces deux variants (Figure 33 et Article 2).

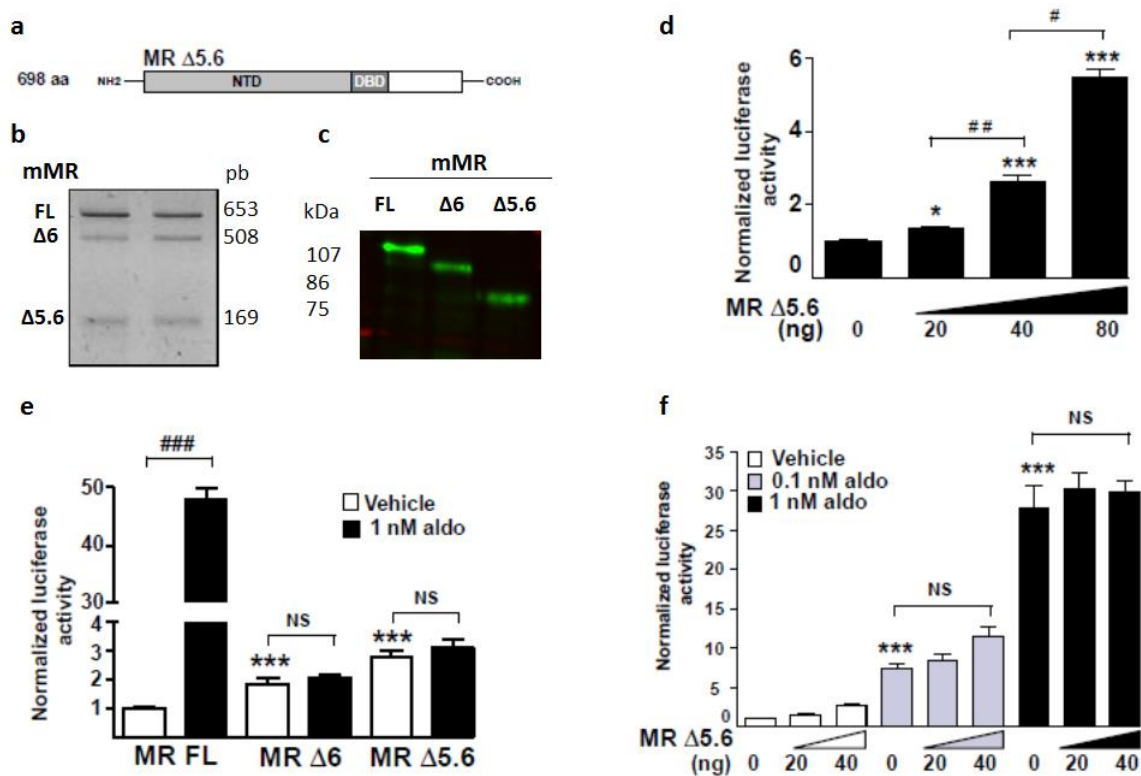


Figure 33 : Identification et caractérisation du variant de épissage $\Delta 5,6$ MR.

(a) Représentation schématique des différents domaines de la protéine mMR $\Delta 5,6$. (b) Détection des transcrits des variants mMR $\Delta 6$, $\Delta 5,6$ et MR FL (full length) par RT-PCR. (c) Transcription/traduction *in vitro* des protéines MR FL, $\Delta 6$ et $\Delta 5,6$ suivi par une analyse en Western Blot. (d,e,f) Les constructions plasmidiques correspondantes aux MR $\Delta 6$ MR $\Delta 5,6$ et MR FL ont été transfectées dans des cellules HEK293T (d) Analyse de l'activité transactivatrice du variant $\Delta 5,6$ par mesure de l'activité luciférase. (e) Détermination de l'activité transactivatrice des variants mMR et du FL en absence et en présence d'aldostérone. (f) Effet potentialisateur de la co-expression du variant $\Delta 5,6$ et du MR FL sur l'activité transactivatrice du récepteur MR sauvage. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de 3 expériences, n= 24. Test statistique : Mann Whitney NS : non significatif, * p<0,05, ** p <0,01 ; *** p<0,001.

Il faut, cependant, souligner que le variant 5,6 MR est très peu exprimé, par rapport au variant 6 MR, dans les cellules KC3AC1. Ce faible niveau d'expression a donc rendu très difficile sa mise en évidence dans les cellules et dans les tissus cibles du MR. L'identification de ce variant témoigne néanmoins que d'autres variants du transcrite MR sont susceptibles d'exister. Notre laboratoire avait déjà identifié, en 2001, un variant 5,6 MR pour le transcrite MR humain, avec de fortes similitudes avec le variant 5,6 MR murin (Zennaro *et al.* 2001). La caractérisation fonctionnelle du variant 5,6 MR humain avait, à l'époque, permis de montrer qu'il ne possède plus de région charnière ni de LBD. Ce dernier agit alors comme un facteur de transcription ligand-indépendant, qui potentialise l'action des récepteurs corticostéroïdes GR et MR humains, grâce à sa capacité à se lier sur l'ADN au niveau d'éléments GRE et à recruter des coactivateurs du MR, tels que SRC-1 ou RIP140. A noter que ce variant 5,6 MR humain, n'est pas capable de former des hétérodimères avec le MR ou le GR (Zennaro *et al.* 2001).

Les variants 6 MR et 5,6 MR murins diffèrent entre eux par la présence ou l'absence du domaine charnière ou Hinge region. Il est donc tentant de penser que ce domaine fonctionnel puisse conférer au variant 6 MR sa capacité à exercer un effet dominant négatif sur le FL MR. Il serait maintenant intéressant de poursuivre la caractérisation de ces variants d'épissage pour mieux comprendre leur mode de fonctionnement et leur possible implication dans certaines situations pathologiques (syndrome de résistance aux minéralocorticoïdes, hypertension, etc.). Un lien fonctionnel ayant, par exemple, été établi, entre la surexpression du variant hGR et le syndrome de résistance aux glucocorticoïdes (van der Vaart & Schaaf 2009). Les travaux présentés dans cette revue indiquent que la majorité des variants d'épissage « C-terminaux » des récepteurs nucléaires présentent des caractéristiques communes au variant 6 MR que nous venons d'identifier. Ces derniers sont décrits comme exerçant un effet dominant négatif et sont moins exprimés que le récepteur sauvage. Mais tous ces variants semblent avoir perdu leur capacité de transactivation. Il est aussi intéressant de noter que les variants d'épissage hTR 2 ou encore hPPAR_{TR}, en plus de réduire l'activité de leurs récepteurs correspondants, sont capables de réduire celle d'autres récepteurs nucléaires (Herman *et al.* 1989; Gervois *et al.* 1999). A la lumière de ces observations, il serait donc pertinent d'analyser l'effet du variant 6 MR sur l'activité transcriptionnelle du GR, ce qui pourrait élargir, un peu plus, la fonction de ce variant dans le contexte rénal. De la même manière, une étude plus exhaustive du patron d'expression des variants du MR et leur régulation dans d'autres cellules cibles de l'aldostérone semble intéressante et pourrait rendre compte d'altérations ciblées spécifiques de la signalisation minéralocorticoïde dans certaines situations physiologiques ou physiopathologiques.

Enfin, nous avons utilisé une stratégie ARN interférence pour démontrer le rôle prépondérant de HuR dans l'édition du variant 6 MR puisque nous avons observé, en condition hypotonique, une augmentation significative du ratio 6 MR/FL MR dans les clones de cellules KC3AC1 exprimant de façon stable les sh_ARN dirigés contre HuR. Il aurait été intéressant, compte tenu de ces résultats, de surexprimer la protéine HuR dans les cellules KCAC1 pour confirmer, par une autre approche, son rôle dans l'édition de variants du transcrit MR, dans la mesure où l'hypotonicité n'augmente pas son expression (Figure 30).

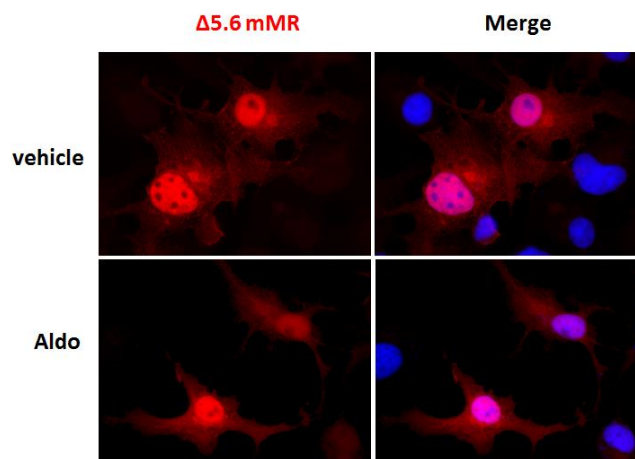


Figure 34 : Immunodétection du variant de passage 5,6 MR dans les cellules COS-7.

Les cellules ont été transfectées avec un vecteur d'expression codant ce variant du transcrit MR. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont incubées pendant 24 h en absence (Vehicule) ou en présence de 10 nM d'aldostérone. Après fixation des cellules au PFA 4%, les cellules sont incubées pendant la nuit, à 4°C, avec l'anticorps 39N anti-MR (dilution 1/800 dans 5% de lait dans du TBST 1X). Le lendemain, les cellules sont lavées plusieurs fois avec du TBST 1X puis incubées pendant 1 h, à température ambiante avec l'anticorps secondaire (dilution 1/15,000). Les cellules sont à nouveau lavées plusieurs fois avec du TBST 1X. Une coloration DAPI permet de marquer les noyaux. Les lamelles sont montées sur une lame puis observées au microscope à fluorescence (grossissement x40).

La caractérisation du variant 5,6, nous a conduit à analyser sa localisation subcellulaire afin de préciser son action potentialisatrice sur l'activité transcriptionnelle du FL MR. Comme on peut le voir à la Figure 34, le variant 5,6 a une localisation majoritairement nucléaire en absence de ligand mais il est également retrouvé au niveau du cytoplasme des cellules COS-7. Cette localisation est probablement essentielle à son action.

Les variations de tonicité extracellulaire modulent-elles l'expression du variant 6 MR ?

Dans la mesure où l'hypotonicité module l'expression de ce variant, nous avons aussi analysé l'effet de l'hypertonycité sur son expression. Alors que l'hypertonycité réprime l'expression du FL MR (Viengchareun *et al.* 2009; Lema *et al.* 2014), nous montrons à

présent que l'hypertonie augmente significativement l'expression du variant 6 MR (Figure 7 de l'Article 2). Ces résultats nous ont alors amenés à étudier la localisation subcellulaire de HuR dans les cellules KC3AC1 incubées en condition hypertonique (Figure 35).

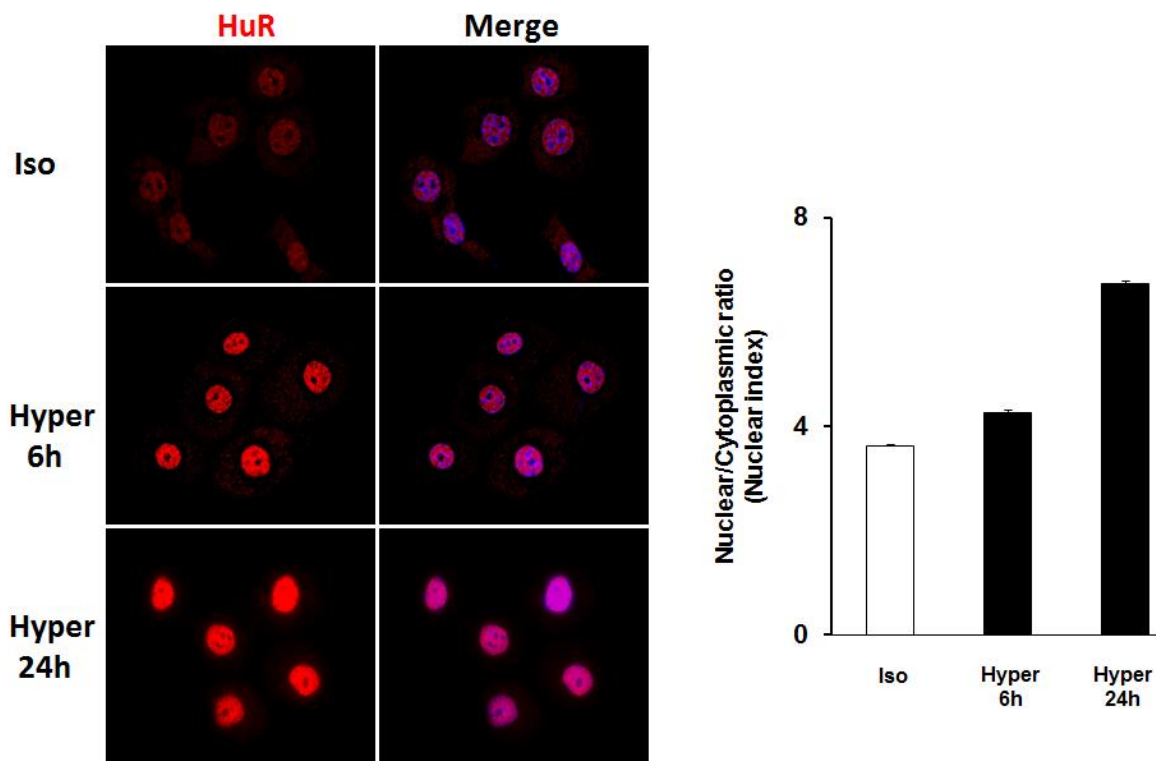


Figure 35 : Analyse de la localisation subcellulaire de HuR par immunocytochimie.

Les cellules KC3AC1 sont cultivées en condition isotonique (Iso) ou en condition hypertonique (Hyper) pendant 6 h et 24 h. L'anticorps 3A2 est utilisé pour la détection de la protéine HuR (dilution 1/500), les noyaux sont marqués au Dapi (1X). Une quantification des protéines HuR localisées dans le noyau et dans le cytoplasme a ensuite été réalisée avec un microscope haut débit (HTM) sur plus de 1000 cellules par condition.

L'analyse de la localisation subcellulaire de HuR présentée sur la Figure 35, révèle une localisation majoritairement nucléaire de la protéine. Ce résultat a été confirmé grâce à la quantification des signaux de fluorescence par microscopie haut débit, qui indique que l'index nucléaire (ratio de fluorescence noyau/cytoplasme) augmente significativement après 6 h d'incubation. Ce phénomène est même exacerbé après 24 h d'incubation en milieu hypertonique. Ce dernier résultat nous interpelle quant à la signification de cette amplification de localisation nucléaire de HuR, et qui pourrait, en partie, expliquer l'augmentation de l'exclusion exonique et favoriser la surexpression relative du variant 6 MR.

Conclusion et perspectives

Les résultats de cette seconde partie du manuscrit nous ont permis de démontrer l'implication de la protéine HuR dans la régulation de l'expression du MR, en favorisant notamment, l'augmentation de son expression lors d'une hypotonie extracellulaire. Nous avons, par ailleurs identifié une nouvelle fonction de HuR dans l'édition de nouveaux variants du transcrit MR.

Ce travail nous interroge à présent sur l'importance de ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle dans la physiologie rénale, en général, puisque l'expression de ces variants d'épissage semble être modulée par les variations de tonicité extracellulaire.

Les études concernant l'épissage alternatif des transcrits se sont révélées pertinentes dans l'étiologie de certaines pathologies telles que le cancer, les maladies neurodégénératives mais aussi dans certains processus physiologiques (apoptose, plasticité neuronale, etc.) et ces études offrent, à ce jour, un grand potentiel thérapeutique. En effet, l'utilisation d'oligonucléotides antisens permet notamment de moduler l'épissage soit en corrigeant un défaut d'épissage, soit en restaurant le cadre de lecture, ou en diminuant l'expression d'une protéine cible (Arechavala-Gomez *et al.* 2014). La confirmation de ces mécanismes d'édition de variants d'épissage, dans l'hypertension artérielle ou dans certaines pathologies rénales, pourrait, dans le futur, ouvrir sur de nouvelles perspectives thérapeutiques.

3^{ème} Partie :

**Contrôle de l'expression rénale du MR par les microARN
en réponse aux variations de la tonicité extracellulaire**

1. Justification du projet

1.1. Contexte de l'étude

Grâce au modèle cellulaire KC3AC1, nous avons pu montrer, pour la première fois, que l'hypertonie réprime l'expression du MR au niveau des transcrits et de la protéine. À l'inverse, l'hypotonie augmente l'expression du MR dans ces cellules. Nos résultats indiquent donc que l'adaptation optimale des cellules rénales aux variations de tonicité extracellulaire est accompagnée d'une modification drastique de l'expression du MR (Viengchareun *et al.* 2009). Par ailleurs, l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents nous a permis de montrer, que des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle affectent tout particulièrement la stabilité du transcrit MR et son renouvellement (Lema *et al.* 2014).

La stabilité des transcrits et leur traduction sont deux événements interdépendants contrôlés soit par des protéines de liaison à l'ARN, soit par des microARN ou miARN (Bartel 2004; Glisovic *et al.* 2008). Les microARN sont des petits ARN non-codants, qui régulent de façon négative l'expression de certains gènes en s'hybridant sur leur cible ARN, responsable d'une inhibition de leur traduction et/ou facilitant leur dégradation (Hartmann *et al.* 2004; He & Hannon 2004).

1.2. Hypothèses de travail

Dans ce contexte, nous avons formulé deux hypothèses de travail non exclusives, qui reposent sur le recrutement de protéines de liaison à l'ARN et/ou de microARN, capables de moduler la stabilité des transcrits MR en réponse aux variations de la tonicité extracellulaire dans le rein. Deux arguments forts viennent notamment corroborer ces hypothèses de travail :

- Il existe, dans la région 3'UTR du transcrit MR, plusieurs éléments ARE sur lesquels des protéines de liaison à l'ARN sont susceptibles de se fixer pour accélérer sa dégradation ou augmenter sa stabilité (Viengchareun *et al.* 2009).
- Nous avons aussi identifié, grâce aux programmes de prédiction Targetscan (Agarwal *et al.* 2015) et miRANDA (Griffiths-Jones 2006), de nombreux sites putatifs de fixation de microARN dans la région 3'UTR de l'ARN messager du MR.

La première hypothèse de travail a été largement abordée dans la 1^{ère} et la 2^e Partie des Résultats de ce manuscrit, avec la démonstration de l'implication des protéines de liaison à l'ARN Tis11b et HuR dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression du MR par l'hypertonie et l'hypotonie, respectivement (Lema *et al.* 2014).

En outre, nous avons montré, dans la 1^{ère} Partie des Résultats, que l'utilisation de siRNA spécifiquement dirigés contre Tis11b, ne parvenait pas totalement à lever l'effet inhibiteur de l'hypertonie sur l'expression du MR. Ces résultats suggéraient donc que d'autres régulateurs post-transcriptionnels étaient susceptibles de contrôler son expression.

Dans cette 3^e Partie des Résultats, nous avons cherché à explorer cette seconde hypothèse de travail, qui repose sur une implication des miARN dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du MR en réponse à un stress osmotique, selon le schéma présenté à la Figure 36.

1.3. Travaux déjà effectués par l'équipe

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait cherché à identifier l'ensemble des miARN régulés par l'hypertonie dans les cellules KC3AC1, par un criblage « screening » à haut débit (Taqman Low Density Array).

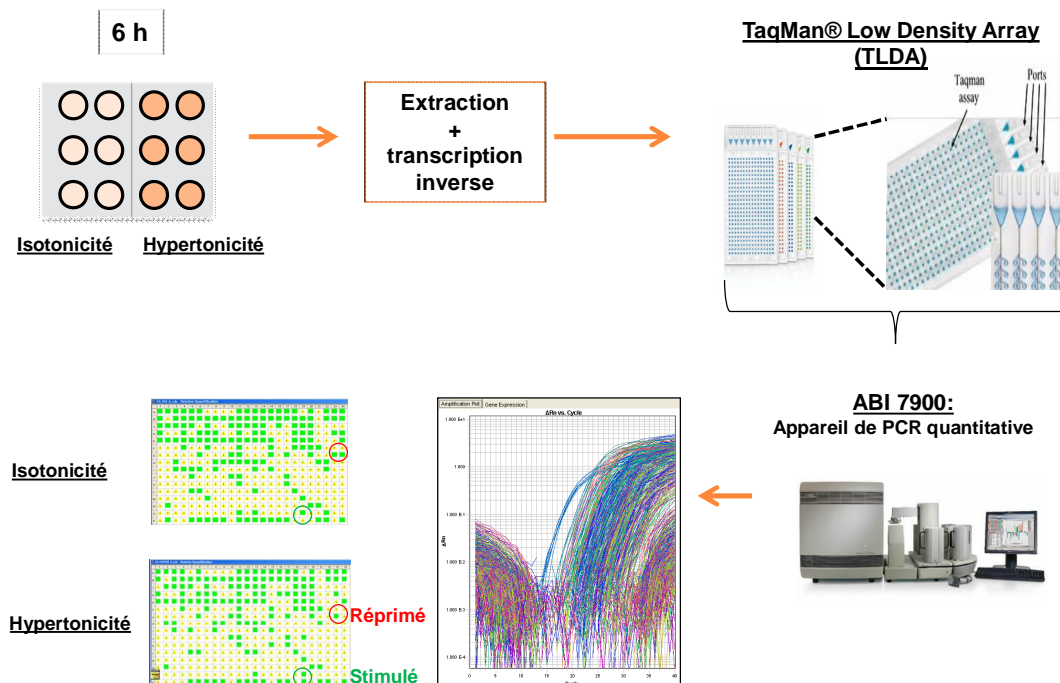


Figure 36 : Stratégie de l'identification des miARN régulés par l'hypertonie par l'approche TLDA.

Les miARN isolés à partir des cellules rénales, ont été rétro-transcrits et leur expression relative en condition « hypertonique » vs « isotonique » a été analysée par PCR quantitative. Grâce à cette approche TLDA, l'équipe a pu identifier une centaine de miARN, dont

L'expression est stimulée par l'hypertonie (Figure 37). Puisque les miARN agissent comme des régulateurs négatifs, l'augmentation de leur expression induite par l'hypertonie pourrait expliquer la baisse de l'expression du MR dans les cellules tubulaires rénales.

miRNA dont l'expression est induite par l'hypertonie (RQ >2, total = 32)

miRNA	RQ	miRNA	RQ
mmu-miR-503	2.139	mmu-miR-148b	8.343
mmu-miR-324-5p	2.246	mmu-miR-542-3p	11.449
mmu-miR-708	2.376	mmu-miR-804	12.262
mmu-miR-126-5p	2.548	mmu-miR-343	15.635
rno-miR-743a	2.554	mmu-miR-881*	15.927
mmu-miR-500	2.561	mmu-miR-295	22.879
mmu-miR-335-5p	2.656	mmu-miR-450a-5p	22.882
mmu-miR-190	2.657	mmu-miR-493	23.747
mmu-miR-324-3p	2.822	mmu-miR-148a	46.386
mmu-miR-190b	3.909	mmu-let-7f*	63.891
mmu-miR-744*	4.035	mmu-miR-335-3p	91.969
mmu-miR-21*	4.31	mmu-miR-501-5p	124.578
mmu-miR-223	5.475	mmu-miR-187	181.042
mmu-miR-199b*	7.652	mmu-miR-674	356.800
mmu-miR-98	7.709	mmu-miR-491	366.400
mmu-miR-875-5p	8.339	mmu-miR-702	376.783

miRNA dont l'expression est réprimée par l'hypertonie (RQ <0,5, total = 65)

miRNA	RQ	miRNA	RQ	miRNA	RQ
mmu-miR-297c	0.003	mmu-miR-24-1*	0.058	mmu-miR-34b-3p	0.199
mmu-let-7b*	0.004	mmu-miR-717	0.059	mmu-miR-27b*	0.223
mmu-miR-546	0.005	rno-miR-489	0.059	mmu-miR-331-5p	0.227
mmu-miR-10b*	0.006	mmu-miR-191*	0.06	mmu-miR-181a-1*	0.234
mmu-miR-326	0.007	rno-miR-29b-2*	0.06	mmu-miR-801	0.252
mmu-miR-141*	0.008	mmu-miR-299*	0.061	mmu-miR-350	0.267
mmu-miR-200c*	0.008	mmu-miR-198a*	0.062	mmu-miR-27a*	0.29
mmu-miR-878-3p	0.008	mmu-miR-653	0.063	mmu-miR-149	0.311
rno-miR-493	0.008	mmu-miR-362-3p	0.085	mmu-miR-339-5p	0.313
mmu-miR-345-5p	0.011	mmu-miR-410	0.085	mmu-miR-218-1*	0.344
mmu-miR-351	0.011	mmu-miR-34c	0.087	mmu-miR-676*	0.387
mmu-miR-671-3p	0.011	mmu-miR-509-3p	0.087	mmu-miR-485*	0.396
mmu-miR-30b*	0.015	mmu-miR-495	0.089	mmu-miR-449a	0.397
mmu-let-7g*	0.016	rno-miR-219-1-3p	0.089	mmu-miR-221	0.4
mmu-miR-202-3p	0.022	mmu-miR-218-2*	0.118	mmu-miR-700	0.414
mmu-miR-363	0.022	mmu-miR-721	0.118	mmu-let-7a*	0.421
rno-miR-351	0.022	mmu-miR-150	0.13	mmu-miR-494	0.428
mmu-miR-128a	0.043	mmu-miR-26b*	0.131	mmu-miR-206	0.435
mmu-miR-145	0.044	mmu-miR-455*	0.157	mmu-miR-181c	0.45
mmu-miR-381	0.044	mmu-miR-125a-3p	0.166	mmu-miR-322*	0.458
mmu-miR-16*	0.044	mmu-miR-805	0.184	mmu-miR-9*	0.469
		mmu-miR-879*	0.189	mmu-miR-29b*	0.482

Figure 37 : Liste des miARN dont l'expression est modulée par les variations de tonicité. Sur 113 miARN identifiés, 32 sont induits et 65 réprimés par l'hypertonie. L'expression relative de chaque miARN ou Relative Quantity (RQ) a été déterminée par la méthode des

$$Ct = Ct_{miARN\ cible} \cdot Ct_{Sno202}$$

$$Ct = (Ct_{miARN\ cible} \cdot Ct_{Sno202})_{hypertonie} \cdot (Ct_{miARN\ cible} \cdot Ct_{Sno202})_{isotonie}$$

$$RQ = 2^{-\frac{Ct}{Ct}}$$

1.4. Critères de sélection des miARN

L'approche TLDA a permis d'identifier rapidement de nombreux miARN dont l'expression est régulée par l'hypertonie. L'approche TLDA, proposée par Applied Biosystems, repose sur l'utilisation de sondes Taqman, qui permettent de quantifier avec une grande spécificité un miARN donné. Mais les coûts expérimentaux demeurent très élevés. En effet, la quantification d'un miARN donné nécessite l'utilisation d'une amorce tige-boucle spécifique de ce miARN lors de l'étape de transcription inverse et l'utilisation d'une sonde Taqman lors de la PCR quantitative.

Des critères stricts de sélection ont donc été retenus afin d'établir une liste minimale de miARN à tester, à savoir :

- La présence de sites putatifs de liaison du miARN candidat sur la région 3'UTR du transcrit MR
- Une augmentation ou une diminution de l'expression du miARN d'un facteur 2
- La capacité du miARN candidat à se fixer à d'autres cibles appartenant à d'autres acteurs de la voie signalisation minéralocorticoïde
- Les données bibliographiques obtenues sur PubMed, associant miARN et fonction rénale

Cette sélection a permis d'établir une liste de 6 miARN :

- ✓ 4 miARN dont l'expression semblait induite par l'hypertonie :
miR-743a-3p, miR-324-5p, miR-335-5p, miR-135a-3p
- ✓ 2 miARN dont l'expression semblait réprimée par l'hypertonie :
miR-721 et miR-30b-3p

Nous avons, par ailleurs, testé l'expression du miR-135a, même si ce dernier n'avait pas été identifié par cette approche TLDA, car son interaction fonctionnelle avec la région 3'UTR du transcrit MR avait été précédemment rapportée (Söber *et al.* 2010).

1.5. Objectifs du travail :

Dans cette dernière Partie des Résultats, nous avons cherché à valider les miARN candidats, qui ont été retenus, en utilisant comme modèle d'étude, les cellules rénales KC3AC1. L'expression de ces miARN candidats a été analysée par la technique de RT-PCR quantitative utilisant cette fois-ci le SYBR green, méthodologie moins sensible et spécifique mais moins onéreuse.

Nous avons cherché à :

- ✓ Confirmer les miARN candidats et à caractériser leur action sur l'expression rénale du MR en réponse à l'hypertonie *in vitro* et *in vivo*
- ✓ Analyser l'impact de l'action de ces régulateurs post-transcriptionnels sur la signalisation minéralocorticoïde
- ✓ Comprendre l'action complémentaire ou compétitive des miARN avec celle des protéines de liaison à l'ARN

Dans cette troisième partie, je présenterai les résultats préliminaires, que nous avons obtenus, à la fois dans le modèle cellulaire KC3AC1 mais aussi dans un modèle de souris soumises à un traitement par le furosémide, un diurétique de l'anse ascendante de Henlé. Une brève discussion complètera ces résultats et je présenterai les perspectives ouvertes par ce travail.

2. Expériences de validation de la méthode de quantification des miARN

Nous avons choisi de quantifier les miARN dans les cellules KC3AC1 en utilisant la technique de PCR quantitative utilisant le SYBR green. Pour cela, nous avons utilisé le kit QuantiMiR RT (Ozyme), qui permet de rétro-transcrire, grâce à l'ajout d'une queue polyA à l'extrémité 3' du miARN, l'ensemble des miARN extraits (Figure 38).

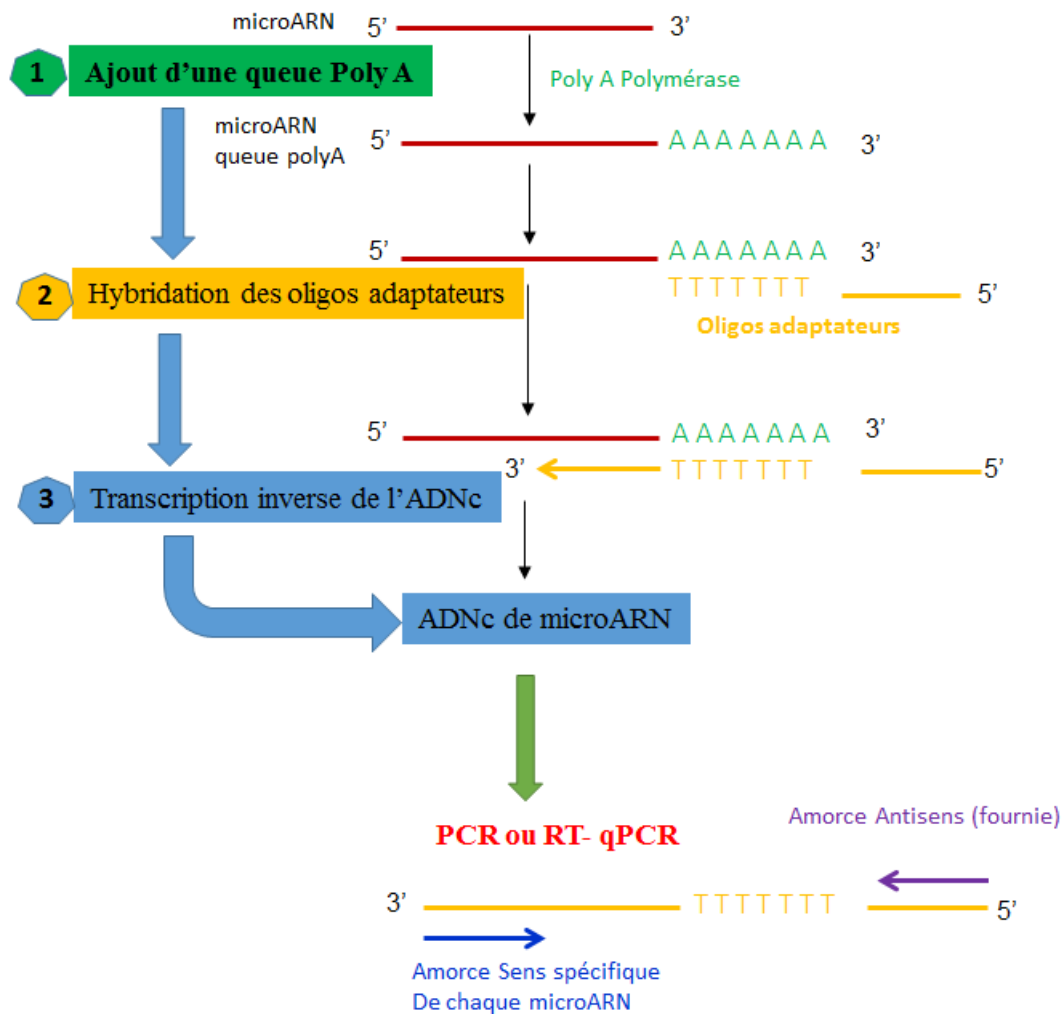


Figure 38 : Description du kit de l'amplification et de détection des miARN QuantiMiR.

Une fois les miARN extraits, une queue polyA est ajoutée à leur extrémité 3'. Un adaptateur oligo-dT est également ajouté et permet la rétro-transcription des miARN. Cet adaptateur présente également une amorce antisens permettant en présence d'une amorce sens spécifique du miARN, l'amplification par la Taq Polymérase de amplicons de 100 à 150 pb et correspondant au miARN rétro-transcrit. Ce produit de PCR est ensuite sous-cloné dans le vecteur plasmidique pGEMTeasy afin d'obtenir un plasmide, permettant de réaliser une gamme standard spécifique de chaque miARN à tester. (D'après Thi An VU, Inserm U1185, *Mémoire de Master 1 de l'Université Paris Descartes*).

Choix des miARN à quantifier

Six miARN ont été présélectionnés suite à l'analyse TLDA : miR-743a, miR-324-5p, miR-335-5p, miR-721, miR-30b, et le miR-135a-3p.

Le Tableau 2 présente la séquence des amorces sens utilisées pour amplifier ces miARN. Nous avons également utilisé une amorce sens pour amplifier le miARN sno202 car ce miARN sert généralement à normaliser l'expression d'un miARN puisque son expression est abondante et peu régulée.

	miARN	Séquençage
1	sno202	GCTGTAAGTACTTGTATGAAAGTACTT
2	743a-3p	GAAAGACACCAAGCTGAGTAGA
3	324-5p	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT
4	335-5p	TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT
5	721	CAGTGCAATTAAGGGGGAA
6	30b-3p	CTGGGATGTGGATGTTTACGTC
7	135a-3p	TATAGGGATTGGAGCCGTGGCG

Tableau 2 : Séquences des amorces sens des miARN utilisés pour la qPCR en temps réel.

Par la suite, nous avons réalisé des expériences de validation pour assurer que ces PCR quantitatives seront suffisamment efficaces et spécifiques pour quantifier un miARN donné.

Obtention d'un plasmide « standard » pour la PCR quantitative

Chaque miARN amplifié par PCR a été cloné par ligation dans le plasmide pGEMT-easy afin de générer un plasmide « standard » utilisable lors de la PCR quantitative pour mesurer l'efficacité de la PCR et quantifier de façon relative l'expression d'un micro RNA donné.

Analyse des courbes de dissociation et calcul de l'efficacité de PCR

La Figure 39A illustre un exemple de courbes d'amplification obtenues avec des quantités décroissantes du plasmide « standard » miR-743a-3p. La Figure 39B présente la courbe de dissociation pour ce miARN, avec un pic unique à la température de fusion de l'amplicon. Cette courbe de dissociation permet, en particulier, de contrôler la spécificité d'une réaction de PCR. En effet, un produit de PCR spécifique génère un pic unique de dissociation à sa température de fusion, alors qu'un produit de PCR non spécifique génère un ou plusieurs pics de dissociation avec une température de fusion généralement inférieure.

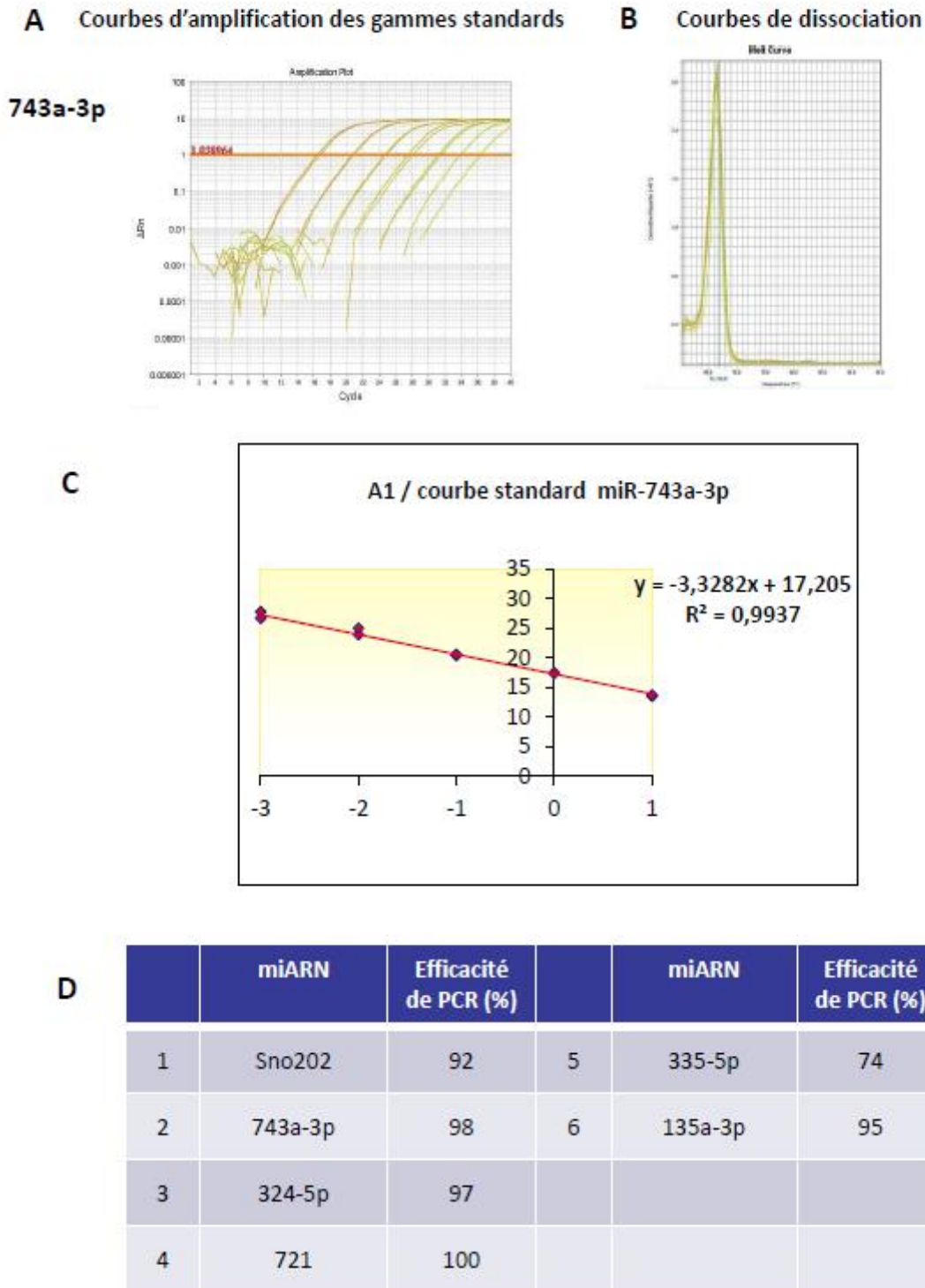


Figure 39: Expérience de validation de la méthode de quantification des miARN.

- (A) Courbes d'amplification des gammes standards
- (B) Courbes de dissociation des miARN
- (C) La droite d'équation obtenue pour l'exploitation des données de la gamme standard
- (D) L'efficacité de PCR pour chaque miARN ($E = 10^{-1/\text{pente}}$)

Par ailleurs, la représentation linéaire des cycles seuils (Ct) obtenus en fonction du logarithme de la quantité en plasmide permet d'obtenir une droite d'équation : $y = ax + b$ (Figure 39C).

C'est à partir de la pente de cette régression linéaire qu'il est possible de calculer l'efficacité de la PCR : une efficacité de PCR de 100% indique que les conditions d'amplification sont optimales car il n'y a pas de facteurs limitants lors de l'amplification. A chaque cycle de PCR, la quantité d'amplicons est alors doublée.

Nous avons évalué ces deux paramètres de qualité pour chaque miARN et les résultats sont présentés sur la Figure 39D. A l'exception de la PCR du miR-335-5p (74% d'efficacité), toutes les autres PCR ont donné une efficacité de PCR proche de 100%, ce qui est largement satisfaisant.

Séquençage du plasmide « standard » pour chaque miARN

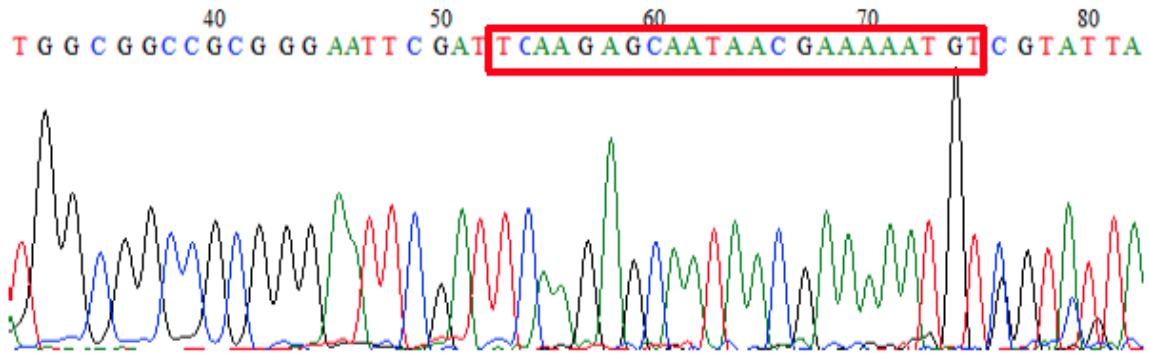
Il était important à ce stade de vérifier l'identité de chaque miARN cloné dans le plasmide pGEMT-easy. Chaque plasmide « standard » a donc été séquençé par la méthode Sanger dans le Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie du CHU de Bicêtre (Pr Anne Guiochon-Mantel).

La Figure 40A montre un exemple de chromatogramme obtenu pour le miR-335-5p. Nous retrouvons grâce à la lecture de ce chromatogramme la séquence exacte du miR-335-5p, ce qui permet de confirmer l'identité du miARN cloné dans le plasmide pGEMT-easy.

La Figure 40B résume les résultats obtenus avec les autres plasmides. Nous avons retrouvé l'identité de tous les miARN clonés.

Au total, ces expériences de validation nous ont permis d'envisager la quantification de l'expression des miARN 743-3p, 324-5p, 335-5p, 135a-3p et 721 dans les cellules KC3AC1 en utilisant le miR sno 202 pour la normalisation des résultats. Seule l'expression du miR-30-3p n'a pas pu être retrouvée dans les cellules rénales KC3AC1.

A Chromatogramme du miR-335-5p



B

	miARN	Séquence	Identité
1	sno202	GCTGTACTGACTTGATGAAAGTACTT	100%
2	743a-3p	GAAAGACACCAAGCTGAGTAGA	100%
3	324-5p	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT	100%
5	335-5p	TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT	100%
6	721	CAGTGCAATTAAGGGGGAA	100%
7	135a-3p	TATAGGGATTGGAGCCGTGGCG	100%

Figure 40: Résultats de séquençage.
(A) Chromatogramme du miARN 335-3p
(B) Résultats de séquençage des standards

3. Résultats préliminaires

3.1. Effet de l'hypertonie sur l'expression des miARN dans les cellules KC3AC1

La Figure 41 présente les résultats de PCR quantitative. L'expression de chaque miARN a été quantifiée dans les cellules KC3AC1 incubées pendant 6 h en milieu isotonique ou hypertonique puis elle a été normalisée à celle du sno202. Les résultats indiquent que l'hypertonie a tendance à augmenter l'expression des miR 335-5p, miR-721 et miR-743a-3p mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative. En revanche, l'expression des miR-324-5p et miR-135a-3p sont significativement augmentées d'environ 2 à 3 fois lorsque les cellules KC3AC1 sont incubées pendant 6 h en milieu hypertonique.

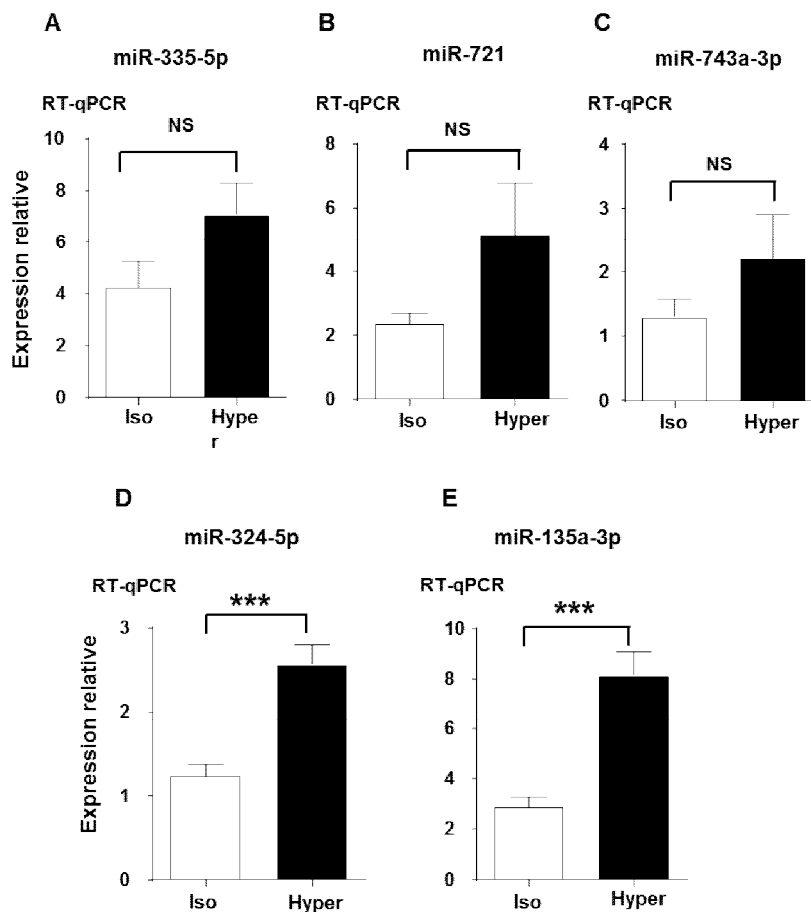


Figure 41 : Effet de l'hypertonie sur l'expression des miARN dans les cellules rénales KC3AC1. Les cellules KC3AC1 ont été incubées pendant 6 h en milieu isotonique (Iso) ou hypertonique (Hyper). L'expression de chaque miARN est normalisée à celle du miR-Sno 202. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne de 8 échantillons pour chaque condition. Test statistique utilisé : Test non paramétrique de Mann Whitney NS : non significatif, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ces résultats préliminaires vont globalement dans le sens des résultats obtenus par l'approche TLDA. En effet, l'expression de miR-743a, miR-335-5p et de miR-324-3p étaient induites par l'hypertonie (Figure 37). En revanche, l'expression du miR-721, qui était réprimée lors de l'analyse TLDA, pourrait être induite dans cette première expérience. Les résultats obtenus par l'approche TLDA doivent être pris avec beaucoup de réserve, car l'expérience a été réalisée avec un nombre faible de réplicats : le risque de faux positifs ou de faux négatifs demeure donc élevé.

3.2. Effet du furosémide sur l'expression des miARN dans le rein de souris

Pour confirmer les résultats obtenus avec le modèle cellulaire KC3AC1, nous avons cherché, par la suite, à analyser l'expression rénale des miARN candidats dans les reins de souris, qui ont été soumis ou non à un stress hypertonique, afin de compléter la pertinence physiologique des hypothèses de travail sur le rôle des miARN dans la régulation de l'expression rénale du MR *in vivo*.

Ces reins, congelés et disponibles au laboratoire, proviennent de la collection de reins obtenus à partir de souris traitées avec des conditions augmentant les flux sodiques distaux (Voir 1^{ère} Partie des Résultats). Il s'agit, en particulier, de reins de animaux traités par le furosémide, un diurétique de la branche ascendante de Henlé. Cet inhibiteur du transporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2) agit sur ce segment néphronique, qui est imperméable à l'eau. En conséquence, le flux de Na^+ est augmenté de façon majeure dans les parties distales du néphron à l'origine d'une augmentation importante relative de la tonicité dans la lumière du tubule.

La Figure 42 présente le résultat de l'expression des miARN candidats censés être régulés par l'hypertonie extracellulaire.

Parmi les 5 miARN candidats, l'expression de miR-135a-3p, miR-721 ne change pas de façon significative dans ces conditions expérimentales, en réponse au traitement par le furosémide. En revanche, l'expression de miR-324-5p, miR-335-5p augmente de façon significative après traitement par le furosémide et donc en réponse à une augmentation de la tonicité luminale ($p < 0,01$ pour miR-324-5p, $p < 0,05$ pour miR-335-5p). A l'inverse, l'expression miR 743a-5p est réprimée de façon significative après traitement par le furosémide ($p < 0,05$). Ce sont, à l'évidence, des résultats préliminaires qui demandent à être dupliqués.

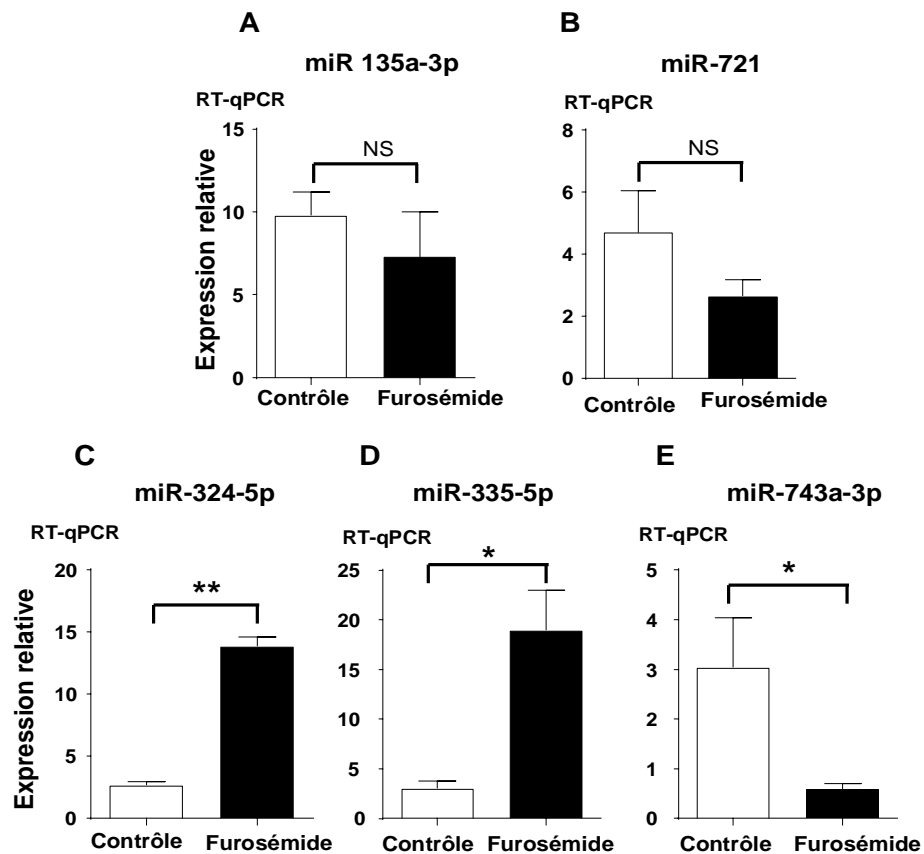


Figure 42 : Expression des miARN dans le rein des souris traitées par le furosémide.

Le furosémide, un diurétique, a été administré 3 h avant le sacrifice des souris afin de mimer l'hypertonie lésionnelle. L'expression des miARN dans le rein des souris traitées est comparée à celle exprimée dans le rein des souris contrôles. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne de 8 échantillons pour chaque condition. Test statistique utilisé : Test non paramétrique de Mann Whitney. NS : non significatif, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Test statistique : Mann Whitney NS : non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4. Discussion

L'objectif de cette 3^e Partie des Résultats consistait à valider, dans les cellules rénales KC3AC1 et *in vivo*, les hypothèses suivantes :

- ✓ L'hypertonie induirait l'expression des miARN 743a-3p, 324-5p, 135a-3p, et 335-5p
- ✓ L'hypertonie réprimerait l'expression des miARN 721 et 30b-3p

Pour atteindre cet objectif, nous avons renoncé à utiliser les sondes Taqman à cause de leur coût élevé et nous avons opté pour le kit QuantiMiR proposé par Ozyme. Ce kit permet l'ajout d'une queue de polyA à l'extrémité 3' de chaque miARN. L'hybridation d'une amorce polyT couplée à une amorce universelle permet alors de rétro-transcrire dans le même milieu

réactionnel tous les miARN exprimés à l'instant t. Il est ensuite aisé d'amplifier n'importe quel miARN en fournissant une amorce sens spécifique de ce dernier et d'utiliser la chimie SYBR Green pour quantifier par PCR quantitative son expression.

Grâce à ce kit, nous avons pu cloner un certain nombre de miARN dans le vecteur pGEMT-easy pour générer des plasmides « standards ». Seul le miR-30b n'a pas pu être cloné car ce miARN ne semble pas être exprimé de façon significative dans les cellules KC3AC1. Pourtant, ce miARN avait été préalablement identifié par l'approche TLDA comme étant un miARN dont l'expression est réprimée par l'hypertonie. Ce résultat souligne qu'il est indispensable de valider les résultats obtenus par l'approche TLDA car elle peut conduire à l'identification de « faux candidats positifs ou négatifs ».

Nos résultats indiquent que l'hypertonie a tendance à augmenter l'expression des miARN 335-5p, 721 et 743a-3p mais cet effet n'est pas significatif. Ces résultats sont néanmoins encourageants pour les miARN 335-5p et 743a-3p car ils vont dans le sens de ceux obtenus avec la TLDA, qui montraient que l'expression de ces mêmes miARN est induite par l'hypertonie. En revanche, les résultats de TLDA suggéraient que l'expression du miR-721 est réprimée par l'hypertonie. Compte tenu des écart-types et du facteur d'induction relativement faible, il est indispensable de confirmer ou d'infirmer ces premiers résultats dans les cellules KC3AC1 avec un nombre de réplicats plus important. Les résultats de PCR quantitative sont plus francs pour les miARN 324-5p et 135a-3p. Nous montrons, en effet, que l'hypertonie augmente de façon significative l'expression du miR-324-5p d'un facteur 2 et l'expression du miR-134a-3p d'un facteur 2,5.

Nous avons ensuite testé l'expression de ces miARN dans le rein de souris traitées par le furosémide car les résultats de l'équipe avaient précédemment montré qu'un traitement par ce diurétique était capable d'induire une hypertonicité luminale relative dans le cortex rénal de ces souris, provoquant une diminution significative de l'expression protéique du MR (Lema *et al.* 2014). Les résultats ne sont pas significatifs pour les miARN 135a-3p et 721 et de nouvelles expériences seront nécessaires. Par contre, l'expression rénale de miR-743a-3p est diminuée de façon significative d'un facteur 6 sous hypertonicité, contredisant les résultats obtenus avec les cellules KC3AC1. En revanche, les résultats indiquent que l'hypertonie augmente de façon significative l'expression du miR-324-5p d'un facteur 5 et l'expression du miR-335-5p d'un facteur 8.

Même préliminaires, nos résultats sont tout de même intéressants car ils mettent en lumière deux miARN, qui méritent toute notre attention :

1. Le groupe de Söber et coll. avait déjà identifié le miR-135a comme un régulateur potentiel de l'expression du MR (Söber *et al.* 2010). Mais ces auteurs n'avaient pas

réussi à montrer que la surexpression du miR-135a modifie l'expression des transcrits MR dans les cellules HeLa, suggérant un impact de ce miARN sur la traduction du MR plutôt que sur la stabilité du transcrit MR. Néanmoins, les cellules HeLa ne représentent pas un modèle cellulaire classique exprimant le MR de façon endogène. On peut ainsi se interroger sur la pertinence de cette lignée pour l'étude des mécanismes post-transcriptionnels de régulation de l'expression d'un MR endogène. Une publication, plus récente, a aussi montré que l'expression de miR-135a est augmentée dans le rein de patients présentant une néphropathie diabétique (He *et al.* 2014). Les auteurs de cette étude ont notamment montré que le miR-135a cible le transcrit du canal calcique TRPC1, impliquée dans l'apparition d'une fibrose rénale. Ces résultats sont très intéressants dans la mesure où les urines des patients diabétiques pourraient être considérées comme hypertoniques du fait de la glycosurie et la diurèse osmotique correspondante. Il serait donc tentant de penser que l'hypertonie urinaire pourrait induire l'expression de miR-135a et réduire l'expression du MR. Il reste, cependant, à préciser les mécanismes sous-jacents impliqués, la localisation des segments tubulaires néphroniques dans lesquels survient cette modification d'expression du miR-135a et enfin à évaluer les conséquences fonctionnelles précises de cette surexpression en terme de réseau de transcrits cibles notamment.

2. Le miR-324-5p est peut-être le plus intéressant des candidats car l'hypertonie augmente de façon significative son expression à la fois dans les cellules rénales KC3AC1 mais aussi dans le rein des souris traitées par le furosémide où l'expression de MR est diminuée en raison de l'hypertonie luminale relative induite par ce diurétique, du fait de l'augmentation des flux sodiques dans les parties distales corticales du néphron. L'utilisation d'une sonde Taqman spécifique du miR-324-5p devrait nous permettre de confirmer précisément que son expression est augmentée par l'hypertonie. Il restera ensuite à démontrer par des expériences de transfection transitoire dans les cellules KC3AC1 comment la surexpression du miR-324-5p entraîne une baisse des transcrits MR. Une étude récente vient de mettre en évidence que le miR-324-5p joue un rôle protecteur contre le carcinome hépatocellulaire (Cao *et al.* 2015) mais aucune donnée n'est disponible sur son action dans le contexte rénal. De façon intéressante, le site web Targetscan indique, que le miR-324-5p pourrait aussi se fixer sur la région 3'UTR du transcrit ELAV1, qui code la protéine HuR, une protéine de liaison à l'ARN, capable de stabiliser le transcrit MR en réponse à l'hypotonie (2^e Partie des Résultats). Ainsi, il serait tentant de spéculer que l'hypertonie serait en mesure d'induire l'expression de miR-324-5p pour déstabiliser le transcrit MR (Lema *et al.* 2014) et/ou le transcrit ELAV1, l'ensemble concourant à restreindre l'expression rénale du MR.

Cette hypothèse est corroborée par les travaux précédents qui ont identifié des effets antagonistes de certaines protéines de liaison de l'ARN notamment entre protéine HuR et la protéine Tis11b sur la stabilité de VEGF dans les glandes surrénales (Cherradi *et al.* 2006). En effet, Tis11b est une protéine de liaison à l'ARN, qui accélère la dégradation du transcrit MR (Lema *et al.* 2014). De façon générale, les mécanismes fins complexes de régulation post-transcriptionnelle des transcrits fait à l'évidence intervenir de multiples facteurs dont les miARN et les protéines de liaison à l'ARN de façon additive, complémentaire ou synergique ou à l'inverse compétitive ou antagoniste comme cela a déjà été évoqué précédemment (Lebedeva *et al.* 2011; Mukherjee *et al.* 2011; Srikantan *et al.* 2012; Xiao & Wang 2014; HafezQorani *et al.* 2016).

Les miARN jouent-ils un rôle dans la physiologie rénale ?

Le rôle fondamental des miARN dans la physiologie rénale a été mis en évidence dans les podocytes, grâce à un modèle murin de validation ciblée de Dicer, une RNase III impliquée dans la biogenèse des miARN. Dans ce modèle, les souris invalidées développent une importante protéinurie trois semaines après leur naissance et une glomérulosclérose (Harvey *et al.* 2008; Shi *et al.* 2008). De la même façon, l'inactivation ciblée de Drosha, une autre RNase III essentielle à la maturation des pre-miARN, conduit au développement d'un phénotype similaire confirmant, encore un peu plus, le rôle primordial des miARN dans les fonctions glomérulaires (Zhdanova *et al.* 2011). Les travaux de Marrone *et al.* ont, par ailleurs, démontré le rôle déterminant des miARN de la famille (ou cluster) miR-17-92 dans la néphrogenèse et la fonction rénale. L'inactivation spécifique de ce cluster de miARN, au niveau des progéniteurs néphroniques, se traduit chez la souris par un nombre réduit de néphrons formés et une atteinte rénale. En effet, les souris transgéniques développent une albuminurie, des lésions du glomérule et une réduction de la fonction glomérulaire (Marrone *et al.* 2014).

Par ailleurs, le rôle des miARN dans la régulation de la physiologie rénale, en général (contrôle de la pression artérielle et de l'homéostasie hydroélectrolytique), a été mis en évidence avec l'inactivation ciblée de Dicer dans les cellules juxtaglomérulaires exprimant la rénine. Les animaux invalidés présentent, en plus d'une réduction de la concentration de rénine plasmatique, une hypertension et une fibrose rénale (Sequeira-Lopez *et al.* 2010; Lorenzen *et al.* 2011).

La découverte récente de miARN régulés par l'aldostérone tend, enfin, à démontrer l'implication des miARN dans les mécanismes adaptatifs rénaux pour la réabsorption sodée et le contrôle de la pression artérielle. Ainsi, il a été rapporté que l'aldostérone est capable

définir l'expression des miARN miR-335-3p, miR-290-5p et miR-1983 dans une autre lignée rénale de cellules principales (mCCD), permettant d'augmenter le transport de Na⁺ relayé par ENaC (Edinger *et al.* 2014). Le rôle des miARN sur le transport des ions a également été démontré dans les fonctions cardiaques et cérébrales (Elvira-Matelot *et al.* 2011). Les auteurs ont, en particulier, montré que la répression de l'expression du miR-192 par l'aldostérone pouvait être à l'origine de l'augmentation de la réabsorption de Na⁺ relayée par le MR.

A noter que l'expression de miR-200c et miR-717 sont réduites en condition hypertonique, ce qui permet l'augmentation de l'expression du facteur de transcription TonEBP, qui est une cible directe de ces miARN (Huang *et al.* 2011). Ces résultats, en plus de valider en partie notre approche « haut débit » pour l'identification des miARN modulés par l'hypertonie, démontrent l'importance de ces acteurs post-transcriptionnels au même titre que les protéines de liaison Tis11b et HuR dans la réponse rénale aux variations de tonicité extracellulaire. Il serait aussi intéressant, dans ce contexte, d'étudier le profil d'expression des miARN en condition hypotonique ou après stimulation par l'aldostérone dans les cellules rénales KC3AC1.

Enfin, les travaux de l'équipe ont démontré l'existence d'une résistance à l'aldostérone durant la période néonatale (Martinerie *et al.* 2009a) qui s'explique principalement par une baisse de l'expression rénale du MR à la naissance (Martinerie *et al.* 2009b). Lors de la gestation, le fœtus est soumis à des variations de la tonicité extracellulaire dans l'environnement aquatique où il se développe. Ces variations de tonicité interviennent avec les changements du liquide amniotique (Na⁺, osmolarité) lors de la grossesse (Underwood *et al.* 2005). Dans ce contexte, il serait tentant d'imaginer que les miARN, mais également la protéine Tis11b, puissent participer au contrôle de l'expression du MR pendant le développement rénal. Les travaux de Tang *et al.*, ont finalement mis en évidence que l'expression de certains miARN varie au niveau rénal entre la période fœtale et l'âge adulte (Tang *et al.* 2011).

Les miARN sont-ils impliqués dans le développement de pathologies rénales ?

Même si la surexpression du miR-324-3p n'a pas pu être confirmée dans les cellules KC3AC1, il est cependant intéressant de noter que son expression a été associée au développement de la fibrose rénale dans les néphropathies progressives à cause de son action sur l'expression de la sérine peptidase Prep (proline endopeptidase) (Macconi *et al.* 2012). Cette sérine peptidase est capable de dégrader les angiotensines, les petits peptides (comme les hormones peptidiques) et de générer le tétra-peptide Ac-SDKP afin de réprimer

la prolifération des fibroblastes rénaux en culture. L'inhibition de l'expression de α -SDKP a notamment été corrélée à une augmentation de la fibrose rénale et cardiaque en présence de facteurs profibrotiques (Cavasin *et al.* 2007). De plus, l'expression du miR-324-3p au niveau des podocytes, des cellules pariétales de la capsule de Bowman et sa forte expression dans les tubules corticaux des rats MWF (Munich Wistar Fromter) suggèrent d'autres fonctions régulatrices de ce miARN dans le néphron (Macconi *et al.* 2012).

L'augmentation de l'expression des membres de la famille miR-135 (miR-135a et miR-135b) a aussi été associée à l'apparition de sévères lésions au niveau du podocytes. Cet effet serait lié à l'action de ces miARN sur l'expression de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et à l'activation de la voie Wnt/ -caténine (Yang *et al.* 2015). Récemment, d'autres fonctions ont été attribuées à l'action du miR-135a, notamment dans la prolifération des cellules cancéreuses (Mao *et al.* 2015) ou dans le contrôle de l'expression de TXNIP (Thioredoxin-interacting protein), une protéine participant aux mécanismes de protection des cellules du myocarde contre l'insuffisance cardiaque après une ischémie/reperfusion ou une hypoxie/reoxygénation (Zhu *et al.* 2015). A noter que les effets sont aggravés en présence de concentrations élevées de glucose. Ces travaux proposent donc que les diabétiques, en exprimant moins de miR-135a, seraient plus sujets à des infarctus du myocarde que les sujets sains, parce qu'ils ont, notamment perdu l'effet protecteur de ce miARN.

Il faut enfin noter que de nombreux miARN, identifiés par notre approche TLDA (Figure 35) sont maintenant connus pour jouer un rôle dans la physiopathologie rénale. On peut, par exemple, citer le miR-30 qui induit des lésions podocytaires (Wu *et al.* 2014), le miR-29b qui est impliqué dans les néphropathies diabétiques, ou encore le miR-223 et miR-148b qui sont responsables de néphropathies à IgA (Edinger *et al.* 2014).

5. Poursuite du projet

Nous devons encore valider les autres miARN identifiés par l'approche TLDA et confirmer leur action sur le transcrit MR. Ensuite, les axes principaux suivants seront poursuivis :

- ✓ Nous testerons la capacité des miARN candidats à accélérer la dégradation des transcrits du MR par cotransfection dans les cellules KC3AC1 de ces miARN avec un plasmide rapporteur Luciférase contenant la région 3'UTR du transcrit MR
- ✓ Des tests fonctionnels sur ces candidats miARN seront réalisés dans les cellules KC3AC1, soit en augmentant, soit en diminuant l'expression de ces miARN grâce à l'utilisation de molécules Pré-miR ou AntagomiR disponibles commercialement (Applied Biosystems)

- ✓ Les conséquences d'une surexpression ou d'une baisse d'expression de ces miARN sur l'expression du MR seront analysées dans les cellules KC3AC1 par RT-PCR quantitative, immunocytochimie et par Western blot
- ✓ Des expériences de compétition pour le contrôle de l'expression du MR par les miARN ou par les protéines de liaison à l'ARN Tis11b et HuR seront également réalisées
- ✓ Les modulations de l'expression du MR observées dans les cellules KC3AC1 seront confirmées *in vivo* chez la souris afin de valider leur relevance physiopathologique. Pour cela, des groupes de 6 souris mâles B6D2 seront soumis à challenges osmotiques (restriction hydrique, gavage, régime, diurétiques) modulant le gradient cortico-papillaire afin de mimer une hypertonicité ou une hypotonicité extracellulaire. L'expression des miARN sera analysée par RT-PCR quantitative dans le rein de ces souris : rein total, cortex et médullaire
- ✓ Le réseau des cibles de ces miARN sera étudié parmi les gènes de la voie de signalisation minéralocorticoïde et nous analyserons les conséquences fonctionnelles sur le transport de sodium

6. Conclusion

Nos résultats, même préliminaires, ont apporté des nouvelles connaissances sur les miR-135a et miR-324-5p, dont l'expression est significativement induite par l'hypertonicité dans les cellules KC3AC1 et dans le rein des souris traitées par le furosémide.

Ce travail a apporté un éclairage nouveau et original sur l'étude du contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR par les miARN.

A plus long terme, un autre volet particulièrement d'actualité concerne l'identification de miARN plasmatiques circulants (Creemers *et al.* 2012) ou urinaires (Beltrami *et al.* 2012), qui pourraient représenter de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou prédictifs dans les maladies rénales.

DISCUSSION GENERALE

Mon travail de Thèse a permis de préciser les mécanismes moléculaires à l'origine de l'expression différentielle du MR le long du tubule rénal et de mettre des hypothèses quant à la modulation de la signalisation minéralocorticoïde rénale.

Nous avons mis en évidence le rôle prépondérant des protéines de liaison à l'ARN (RBP), Tis11b et HuR et potentiellement celui des miARN dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR. Nous avons également démontré que cette régulation fine de l'expression du MR est en relation avec les variations de tonicité extracellulaire qui prévalent dans certains segments néphroniques, du fait de l'existence du gradient corticopapillaire. Ces variations osmotiques extracellulaires ou luminales induisent l'expression de certains acteurs post-transcriptionnels afin de moduler l'expression rénale du MR affectant, en conséquence, la sensibilité et la réponse à l'aldostérone de la cellule rénale. En effet, nous avons pu démontrer l'impact des variations de l'expression du MR sur la signalisation minéralocorticoïde, notamment sur son gène cible *Sgk1* (Lema *et al.* 2014).

L'expression de certains miARN, au même titre que celle des RBP, semble être modulée par l'osmolarité extracellulaire aussi bien dans le modèle de cellules rénales KC3AC1 qu'*in vivo*, dans le rein chez l'animal.

Nous avons également identifié de nouveaux variants de épissage du MR murin (6 MR et 5,6 MR) et avons démontré que l'action nucléaire de HuR sur le pré-messager du MR est à l'origine du saut d'exon, nécessaire à l'édition de ces variants. Ces deux variants exercent des effets opposés sur l'activité transcriptionnelle du MR sauvage, modifiant ainsi le niveau d'activation de la signalisation minéralocorticoïde et donc le degré de réponse à l'aldostérone. Ces résultats originaux mettent en lumière un niveau supplémentaire et plus complexe de la régulation hydrosodée, assurée par le MR et l'aldostérone au niveau rénal, et rendent compte de la variété des mécanismes responsables de l'adaptabilité du rein aux variations de son environnement. La description de ces données nouvelles nous interpelle sur la généralisation des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle du MR dans des cellules cibles autres que rénales (cellules neuronales, cardiaques, vasculaires ou adipocytes) et sur les stimuli impliqués, autres que l'osmolarité.

Ces résultats originaux nous invitent, à présent, à formuler d'autres questions :

- ✓ Quel est l'impact de ces régulations post-transcriptionnelles sur la fonction rénale et l'équilibre de la balance hydrosodée ?
- ✓ Ces mécanismes post-transcriptionnels sont-ils mis en place au cours du développement rénal ?
- ✓ Participent-ils à la résistance partielle à l'aldostérone observée au cours de la période périnatale chez les nouveau-nés ?
- ✓ Quelle est la contribution relative des protéines de liaison et des miARN dans le développement des pathologies rénales ?
- ✓ Est-ce que ces mécanismes de contrôle post-transcriptionnel peuvent être étendus aux autres tissus cibles du MR ?
- ✓ Quel est l'impact de ces modulations post-transcriptionnelles sur le GR et sa signalisation ?

Nous allons, dans ce dernier chapitre, tenté de discuter de ces éléments, à la lumière des résultats présentés dans ce manuscrit et des autres travaux réalisés mais aussi des données de la littérature.

Variations de la tonicité extracellulaire, fonction rénale et régulation post-transcriptionnelle

Le rein est un organe essentiel au maintien de l'homéostasie hydrosodée (Guyton 1991). Il participe, notamment, au contrôle de la production des urines, dont la composition varie en fonction des besoins de l'organisme. L'urine primitive voit sa composition intra-luminale se modifier tout le long des différents segments néphroniques du fait de l'existence d'un gradient corticopillaire, qui génère d'importantes variations de la tonicité extracellulaire au niveau de laanse de Henlé, permettant ainsi, les phénomènes de concentration et de dilution des urines essentiels à la réabsorption de sodium et d'eau (Dantzler *et al.* 2014). Néanmoins, c'est dans les segments néphroniques distaux que a lieu la régulation fine et hormono-réglée de la réabsorption de sodium. En effet, ces segments tubulaires sont sensibles à l'action de l'aldostérone, qui par sa liaison à son récepteur, module l'expression

d'un certain nombre de transporteurs ioniques. Cette signalisation hormonale est essentielle à l'adaptabilité rénale aux différents apports quotidiens.

Pour la première fois, nous avons pu mettre en évidence la relation qui existe entre les variations de l'osmolarité extracellulaire et l'expression rénale du MR. Ce lien entre la tonicité et l'expression du MR est étayé par l'action de certains régulateurs post-transcriptionnels. En effet, l'expression de ces acteurs est modulée en fonction de la tonicité (hypertoncité ou hypotoncité), conduisant à une modification de la réponse et de la sensibilité rénale à l'aldostérone et donc, de façon ultime, au contrôle de la réabsorption tubulaire de Na^+ (Viengchareun *et al.* 2009; Lema *et al.* 2014). Nos travaux préliminaires sur les miARN nous ont aussi révélé l'impact de ces variations de tonicité sur l'expression d'une centaine de miARN (3^{ème} partie Résultats).

Il est important de souligner que d'autres travaux vont dans le sens de ces observations. On peut citer notamment les travaux de Mladinov *et al.*, qui ont analysé, dans un modèle de rat, l'expression des miARN dans différents segments néphroniques (Mladinov *et al.* 2013). Ces auteurs ont ainsi démontré que l'expression des miARN pouvait être classée en deux groupes ; ceux exprimés de manière homogène et stable dans tous les segments du néphron et ceux, au contraire, dont l'expression varie en fonction du segment néphronique. En effet, de nombreux miARN sont exprimés dans le PCT et ne le sont pas dans le mTAL. Cette observation est particulièrement pertinente si l'on considère que les cellules rénales des différents segments néphroniques n'ont pas la même origine embryonnaire (le métanéphros rénal) et, qu'au cours du développement, ces cellules rénales évoluent différemment et seront ensuite exposées à différentes osmolalités extracellulaires interstitielles ou luminales, variant en fonction de leur localisation cortico-médullaire de 50 à 1200 mOsmol/kg (Doucet & Katz 1981; Kuure *et al.* 2000; Fenton & Knepper 2007; Mladinov *et al.* 2013). Ces données renforcent l'idée d'un rôle particulier de ces miARN dans la spécification des propriétés cellulaires rénales intrinsèques qui varient en fonction du segment tubulaire. Elles apportent aussi un argument supplémentaire en faveur de leur implication potentielle dans la régulation différentielle de l'expression du MR dans les cellules tubulaires.

Cette capacité de la cellule rénale à s'adapter aux variations de tonicité peut être également mise en parallèle avec certaines espèces de poissons (Salmonidés) qui ont la capacité à s'adapter aux changements d'osmolarité du milieu extérieur, notamment lors du passage de l'eau douce à l'eau de mer (smoltification) et inversement (dé-smoltification). Cette faculté d'adaptation s'accompagne de changements physiologiques et physiques chez le poisson. Les hormones y jouent un rôle majeur, notamment grâce à leur fonction osmo-régulatrice, en

permettant par exemple l'expression de différents récepteurs hormonaux comme le GHR (Growth Hormone Receptor), PRLR (Prolactin Receptor), GR1, GR2 et le MR (Kiilerich *et al.* 2007). Chez les poissons téléostéens, contrairement à l'espèce humaine, le cortisol est le ligand physiologique principal des récepteurs GR1, GR2 et MR. Les poissons n'expriment pas l'enzyme CYB11B2 ou 11 β -hydroxylase qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse des minéralocorticoïdes. Dans ces conditions, ils ne peuvent donc pas synthétiser ni sécréter de l'aldostérone (Jiang *et al.* 1998). Néanmoins, de nombreuses espèces de poissons expriment le MR, sa première caractérisation ayant été faite chez la truite arc-en-ciel (Sturm *et al.* 2005) puis a été étendue au saumon atlantique ou encore à la carpe (Greenwood *et al.* 2003; Kiilerich *et al.* 2007; Stolte *et al.* 2008). Le cortisol assure donc une fonction importante dans la régulation de la balance hydrominérale et permet *via* ses deux récepteurs GR1 et GR2, une adaptabilité aux changements d'osmolarité de l'eau. Le cortisol, *via* le MR, stimule également la différenciation et la prolifération des cellules chlore au niveau des branchies. Ces cellules sont également le siège du contrôle de la balance hydrominérale (Kiilerich *et al.* 2007). De manière intéressante, la smoltification (passage de l'eau douce à l'eau salée) provoque une augmentation de la sécrétion de cortisol et une augmentation de l'expression du transcrite GR alors que l'expression du MR est diminuée. A l'inverse, l'expression du MR est augmentée au cours de la dé-smoltification (Kiilerich *et al.* 2007), c'est à dire lors du passage de l'eau de mer à l'eau douce, correspondant donc à une baisse de l'osmolarité du milieu extérieur. Ce phénomène n'est pas sans rappeler les données que nous avons obtenues, sur la diminution de l'expression rénale du MR sous hypertonicité et, à l'inverse, son augmentation après exposition des cellules rénales de mammifères à une hypotonie extracellulaire. La mise en évidence, chez les poissons téléostéens, d'une expression des miARN et de leur rôle dans l'adaptation aux stimuli environnementaux et, notamment, aux variations de tonicité revêt un intérêt particulier au vu de nos résultats sur la corrélation inverse existant entre l'expression du MR dans les cellules rénales et les variations de tonicité extracellulaire.

Les cellules tubulaires résistent à un stress hypertonique grâce à l'action du facteur de transcription TonEBP (ou NFAT5), qui stimule la production d'osmolytes intracellulaires tels que le sorbitol pour contrer l'hypertonie extracellulaire (Burg *et al.* 2007). Dans ce contexte, il est intéressant de mentionner les travaux de Huang *et al.* qui ont rapporté que l'expression de TonEBP est régulée par certains miARN. En effet, ces auteurs ont montré que l'expression du miR-200b et du miR-717 sont significativement réduites lorsque les cellules mIMCD3 de la médulla interne sont exposées pendant 2 h à un stress hypertonique, afin de prévenir leur action répressive sur l'expression de TonEBP (Huang *et al.* 2011). Récemment, d'autres travaux ont rapporté une surexpression de 21 miARN en

réponse à l'hypertonie dans ces mêmes cellules IMCD3 (Luo *et al.* 2014). Dans ces mêmes travaux, une fonction régulatrice du miR-466a-3p sur l'expression de TonEBP a été démontrée (Luo *et al.* 2014). La surexpression de ce miARN a, en effet, des conséquences fonctionnelles importantes *in vivo* chez la souris transgénique. L'expression rénale de TonEBP est fortement réduite ainsi que celle de différentes cibles de ce facteur de transcription. Les auteurs ont noté une baisse de l'expression de l'aldose réductase et du sodium-myoinositol co-transporteur qui s'accompagne de la réduction des transporteurs de durée et des canaux aquaporines. De façon intéressante, ces souris transgéniques surexprimant le miR-466a-3p sont polyuriques et polydipsiques, confirmant l'interaction fonctionnelle de la signalisation rénale de TonEBP et l'osmorégulation.

L'importance du contrôle post-transcriptionnel de l'homéostasie osmotique par les miARN a également été démontrée chez le poisson Zébrafish. En effet, les 5 membres de la famille miR-8/miR-200, dont miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 et miR-429, sont exprimés au niveau des ionocytes, des cellules de l'épiderme spécialisées dans le maintien de l'homéostasie osmotique avant le développement des branchies. Lorsque l'expression de membres de la famille miR-8/miR-200 est contrée par l'utilisation de morpholinos, qui sont des oligonucleotides antisens, les poissons zébrafish perdent leur capacité à s'adapter aux variations de tonicité. Ceci se traduit notamment par une accumulation de sodium dans les ionocytes, mesurée par le colorant sodium green (Flynt *et al.* 2009). Par ailleurs, il a été rapporté que le miR-30c et le miR-429 agissent sur différents transporteurs ioniques tels que Nherf1 (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1) chez le zébrafish et OSTF-1 (Osmotic transcription factor-1) chez le poisson tilapia (Flynt *et al.* 2009; Yan *et al.* 2012a, b). Les travaux de Mladinov *et al.*, vont dans le même sens. En effet, l'analyse bioinformatique des miARN exprimés différemment dans les segments PCT et mTAL du néphron ciblent potentiellement des transporteurs ioniques, suggérant un rôle plus vaste des miARN dans le maintien de l'homéostasie hydrosodée, chez le poisson, la souris et l'homme par extension (Mladinov *et al.* 2013). Cela atteste également d'une certaine conservation de ces mécanismes post-transcriptionnels au niveau des organes osmorégulateurs (Flynt *et al.* 2009; Mladinov *et al.* 2013; Bizuayehu & Babiak 2014).

L'impact des miARN dans la fonction rénale est probablement plus important qu'attendu. En effet, de nouvelles données font état d'une modulation de l'expression de certains miARN par l'aldostérone. Les travaux de Eddinger *et al.* ont notamment montré un effet de l'aldostérone sur le transport de Na⁺ via une régulation de l'expression des miARN. En effet, lorsque les cellules du CCD sont soumises à l'action de l'hormone, l'expression de 3 miARN est clairement réduite (miR-335-3p, miR-290 et miR-1983), ces derniers miARN ciblant le transcrite de l'ankyrine 3, un gène cible de l'aldostérone capable d'agir directement sur le

canal ENaC (Edinger *et al.* 2014). On peut également citer, le miR-192 qui cible le transcrite de kinase L-WNK1 et dont l'expression est réprimée en présence de l'aldostérone. Il est intéressant de noter, que dans ce même travail, une déplétion sodée ou une charge potassique module l'expression rénale des miARN. Ces données apportent des arguments supplémentaires en faveur du rôle de l'aldostérone dans le contrôle de la balance sodium/potassium *via* l'action de miARN (Elvira-Matelot *et al.* 2010). De façon encore plus générale, on peut également citer le miR-24 qui régule la production de l'aldostérone et de cortisol dans le cortex surrénalien humain (Robertson *et al.* 2013). La revue de Butterworth, recense, par exemple, plusieurs miARN capables de réguler négativement le système rénine-angiotensine-aldostérone (Butterworth 2015). Ainsi, les miARN, en intervenant sur différents effecteurs de la signalisation minéralocorticoïde, pourraient moduler la balance hydroélectrolytique en agissant notamment sur l'expression et l'activité du canal ENaC (Rakova *et al.* 2013; Rossier 2014).

Enfin, il est intéressant de noter, que la 11 HSD2, l'enzyme responsable de la sélectivité minéralocorticoïde au niveau « pré-récepteur » (Funder *et al.* 1988; Pascual-Le Tallec & Lombès 2005) est également régulée par les miARN. L'expression de 11 HSD2 n'est pas constante le long du néphron : son expression est importante dans les parties distales du néphron (DCT2, CNT et CCD) et elle est plus faible au niveau du DCT1 et du TAL (Rossier *et al.* 2013; Hunter *et al.* 2014). Ce patron d'expression différentielle est une caractéristique essentielle à la définition de l'ASDN (Bachmann *et al.* 1999; Reilly & Ellison 2000; Farman & Rafestin-Oblin 2001) puisqu'il est clairement établi qu'une réduction de l'activité de la 11 HSD2 conduit, en particulier, à une suractivation de la signalisation dépendante du MR dont l'activité transcriptionnelle est stimulée par l'occupation illicite par l'excès de cortisol non métabolisé, entraînant une rétention sodée et une augmentation de la pression artérielle sensible au sel (Kotelevtsev *et al.* 1999; Ferrari *et al.* 2001). Les travaux de Rezaei *et al.* ont tenté de mieux comprendre l'expression différentielle de la 11 HSD2 dans les segments néphroniques. Pour cela, ils ont analysé l'expression des miARN dans le CCD et le PCT. Cette analyse sur puce a révélé, que sur 375 miARN, 53 sont différemment exprimés en fonction du segment et 13 ciblent potentiellement le transcrite de la 11 HSD2. L'autre fait marquant de cette étude réside dans l'expression différentielle des miARN qui n'est pas équivalente en fonction de la souche de rat : Sprague-Dawley ou Wistar. En effet, l'activité de 11 HSD2 est plus faible chez le rat Sprague-Dawley, qui possède par ailleurs une sensibilité au sel différente. Ces observations renforcent l'idée selon laquelle les miARN pourraient participer à la pathogenèse de l'hypertension artérielle sensible au sel (Rezaei *et al.* 2014)

A la lumière de ces différents travaux, l'action des régulateurs post-transcriptionnels dans la physiologie rénale ne fait plus aucun doute et vont dans le sens des travaux présentés dans ce manuscrit. Mais de façon plus globale, l'ensemble des données de la littérature et nos propres données démontrent que l'adaptabilité du rein repose sur des mécanismes fins de régulation, impliquant de nombreux acteurs, qui participent au bon fonctionnement rénal. Ce constat complexifie encore un peu plus les relations intriquées et les mécanismes moléculaires sous-jacents, impliqués dans le contrôle de l'expression rénale du MR. Dans ce contexte, l'identification et la caractérisation des cibles de ces différents miARN dans les différents segments néphroniques pourrait apporter des connaissances supplémentaires sur la physiopathologie rénale.

Mécanismes post-transcriptionnels et développement rénal

Les travaux menés au cours de ma Thèse ont démontré qu'une partie de l'adaptabilité rénale repose sur les changements d'expression du MR. Ces résultats originaux peuvent être mis en relation avec d'autres travaux de l'équipe concernant l'expression rénale du MR durant la période périnatale. En effet, nous avons observé à la naissance une réduction marquée de l'expression rénale du MR, accompagnée d'une expression très faible ou nulle de la 11 HSD2 dans les parties distales du néphron, aussi bien chez l'homme que chez la souris. Ceci contrastait avec l'hyperaldostéronisme et plaidait en faveur d'une résistance partielle à l'aldostérone chez le nouveau-né (Martinerie *et al.* 2009a, b). Il a été alors proposé qu'il s'agissait d'un mécanisme physiologique de protection du tubule rénal contre une suractivation de la signalisation minéralocorticoïde face aux concentrations plasmatiques élevées d'aldostérone observées à la naissance. Il a aussi été proposé l'existence d'une fenêtre temporelle d'action de la voie glucocorticoïde dans la cellule tubulaire rénale pendant cette période, dans la mesure où l'expression rénale du GR est relativement constante et semble apparaître avant celle du MR au cours du développement rénal (Martinerie *et al.* 2009b). Par ailleurs, l'évolution de l'expression différentielle de plusieurs corégulateurs du MR et du GR, qui reste à établir avec précision, ainsi que l'absence d'expression et d'activité de la 11 HSD2 rénale autour de la période périnatale, sont autant d'arguments en faveur d'une contribution relative précise et coordonnée des voies de signalisation corticostéroïde au cours de la mise en place et de la maturation de la fonction rénale (Martinerie *et al.* 2011, 2013).

De façon intéressante, lors du passage de la vie fœtale aquatique à la vie extra-utérine terrestre, le nouveau-né est soumis à de brusques changements de tonicité extracellulaire et doit s'adapter rapidement et efficacement aux variations de rapports hydroélectrolytiques préalablement contrôlés par la mère. En effet, le volume et la composition du liquide

amniotique évoluent considérablement au cours de la grossesse. Le changement de composition ionique du liquide amniotique est contemporain du processus de kératinisation de la peau du fœtus et des structures extra-embryonnaire vers la 25^{ème} semaine de gestation (Holbrook & Odland 1980). A noter également que lors de la kératinisation, les échanges entre les différents compartiments (espace amniotique et tissus) deviennent actifs (Underwood *et al.* 2005). Parallèlement, c'est pendant cette période particulière du développement fœtal que l'expression transitoire du MR est observée au niveau rénal. Dans ce contexte, l'émergence de l'expression rénale du MR pourrait constituer une réponse à ces compartimentations par secteur (milieu intérieur, milieu extérieur, le moi, le non moi) et la nécessité de ces transports ioniques adaptés ou à l'inverse en être la conséquence. Les mécanismes moléculaires qui concourent à l'établissement de l'expression du MR restent à établir. Néanmoins, nos travaux ont démontré que les protéines de liaison à l'ARN, Tis11b et HuR, et potentiellement les miARN, pourraient représenter des acteurs essentiels dans le contrôle et l'apparition de l'expression du MR pendant cette période critique du développement rénal. De plus, comme nous venons le voir, les miARN assurent un important rôle sur la fonction rénale et au delà (branchies chez les poissons, possiblement au niveau pulmonaire chez les mammifères) dans le maintien de l'homéostasie hydrosodée, ce qui corrobore un peu plus l'hypothèse de leur implication fonctionnelle dans la période périnatale. Enfin, l'expression différentielle des miARN chez le fœtus et l'adulte, pourrait également participer à une action ciblée et répressive sur le transcrite MR coïncidant avec la baisse d'expression rénale du MR observée autour de la période néonatale (Martinerie *et al.* 2009b; Tang *et al.* 2011).

Actuellement, très peu de données sont disponibles sur le rôle de Tis11b dans le rein. Nous avons cependant identifié cette protéine comme étant une cible directe de TonEBP sous hypertonicité, en plus de sa fonction déstabilisatrice sur le transcrite du MR. Le rôle de Tis11b est néanmoins important pour le développement. En effet, son invalidation est létale chez la souris (Stumpo *et al.* 2004) et son expression étendue à de nombreux tissus suggère un rôle plus général et conséquent de cette RBP. Nos travaux ont, par ailleurs, démontré une expression plus large de Tis11b dans les segments néphroniques, comme l'indique le faible marquage immunohistochimique de Tis11b dans les tubules proximaux et distaux chez la souris. L'expression relative de Tis11b semble augmenter de façon marquée dans les cellules tubulaires rénales chez les souris soumises à un régime riche en sel (Lema *et al.* 2014). Ces résultats sur l'expression rénale de Tis11b et sa régulation nous invitent à entreprendre une analyse plus précise et une caractérisation plus approfondie des fonctions de cette RBP au delà de son impact sur la signalisation minéralocorticoïde. Par ailleurs, l'ontogénèse rénale de TonEBP révèle une augmentation progressive de son expression au

cours du développement (résultats non publiés). Nous formulons l'hypothèse selon laquelle ce facteur de transcription pourrait induire l'expression de *Tis11b* afin de réduire celle du MR dans la période périnatale. Une intervention des miARN modulés par la tonicité dans le contrôle de l'expression du MR pourrait également être impliquée dans la réduction de l'expression du MR observée à la naissance. Cela nécessitera une étude de leurs niveaux d'expression relative et leurs cartographies au cours du développement rénal.

Par ailleurs, le rôle des miARN sur le développement rénal, notamment dans la néphrogenèse a pu être démontré grâce à l'inactivation ciblée du cluster miR-17-92 au niveau des progéniteurs néphroniques. Cette inactivation conduit à une réduction du nombre de néphrons formés et à une atteinte rénale chez la souris (Marrone *et al.* 2014). De même, l'inactivation ciblée de *Dicer* au niveau des progéniteurs de l'épithélium tubulaire rénal provoque un arrêt de la néphrogenèse soulignant une fois encore l'importance des miARN dans le développement rénal (Nagalakshmi *et al.* 2011).

MR, physiopathologie et régulation post-transcriptionnelle

Comme nous l'avons en partie évoqué dans le chapitre 2.8, de nombreux travaux, chez l'homme et le rongeur, ont mis en évidence une altération de la voie minéralocorticoïde notamment lors d'une surexpression de l'expression du MR. Néanmoins, l'ensemble des mécanismes, qui contrôlent l'expression et/ou l'activité du MR (incluant les modifications post-traductionnelles), ne sont pas encore parfaitement identifiés, à ce jour. Il a été démontré, par exemple, que l'hyperactivation de la voie de signalisation minéralocorticoïde a des conséquences délétères chez l'homme, telles que la rétention sodée, l'expansion volémique et l'hypertension artérielle, mais également à terme peut conduire à une atteinte rénale (fibrose et protéinurie) (Quinkler *et al.* 2005). A la lumière de nos résultats relatant les mécanismes post-transcriptionnels mis en place à la suite de variations de tonicité et des nombreuses démonstrations sur l'implication des miARN et RBP dans le développement de pathologies, ces éléments concordants apportent des arguments forts en faveur d'une relation fonctionnelle entre RBP, miRNA, régulation de l'expression du MR et l'étiopathogenie de certaines maladies. Ceci est corroboré par la démonstration que en dehors de la tonicité extracellulaire, la régulation de l'expression des miARN fait intervenir de nombreux autres facteurs (aldostérone, angiotensine II, rénine, δ).

Nous proposons donc que les mécanismes post-transcriptionnels doivent être considérés aujourd'hui comme d'importants modulateurs des processus biologiques, permettant une réponse cellulaire rapide et adaptée à un stress. La régulation post-transcriptionnelle intervient à différents niveaux sur le transcrit (épissage, stabilité, traduction, dégradation) afin

confluer sur son devenir. Le dérèglement de cette voie de contrôle de l'expression génique conduit dans de nombreux cas au développement de pathologies (Chen & Weiss 2015; Neelamraju *et al.* 2015). En effet, de nombreux liens entre les acteurs post-transcriptionnels et le développement de maladies ont pu être établis. Au niveau cardiaque par exemple, le rôle des miARN et des RBP dans l'apparition d'une fibrose ou d'un remodelage cardiaque a été démontré (Ono *et al.* 2011; Srikantan & Gorospe 2012; Pullmann & Rabb 2014). Il est déjà établi que le MR au niveau cardiaque est un déterminant majeur de la fibrose ou du remodelage cardiaque (Fejes-Tóth & Náray-Fejes-Tóth 2007; Viengchareun *et al.* 2007). Plusieurs travaux ont également démontré que le facteur TGF- β est impliqué dans le développement de fibrose tissulaire. D'ailleurs, l'expression de ce facteur est régulée *via* l'action de miARN dans les cellules mésangiales mais aussi *via* l'action de HuR dans les cellules hépatostellaires et même par le MR lors d'un excès de minéralocorticoïdes (Lang & Stournaras 2013; Pullmann & Rabb 2014; Ge *et al.* 2016). La revue de Pullman *et al.* souligne l'action de TGF- β sur l'expression du miR-216a qui, par son action inhibitrice sur la RBP YB-1 (Y-box Binding protein 1), réduit l'expression du facteur de transcription Tsc-22 (TGF-beta-Stimulated Clone-22) qui, à son tour, régule l'expression du collagène de type 1. Cette cascade d'événements, initiée par l'action de TGF- β , concourt au remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque et au développement de la fibrose (Uchida *et al.* 2003; Pullmann & Rabb 2014). Par ailleurs, Lang *et al.* ont démontré que l'excès de minéralocorticoïdes stimule l'expression et l'activité de Sgk1 qui, par son activité répressive sur Nedd4L, augmente l'expression des facteurs Smad 2/3 et TGF- β conduisant au développement d'une fibrose tissulaire (Lang & Stournaras 2013). Il serait tentant de proposer que lors d'un excès de minéralocorticoïdes, HuR ou des miARN agiraient de façon synergique pour augmenter en parallèle l'expression du MR et celle du TGF- β .

Il est clairement établi que l'utilisation d'antagonistes du MR a des effets bénéfiques majeurs chez l'homme contre le développement de certaines pathologies cardiovasculaires, en particulier l'insuffisance cardiaque, la fibrose cardiaque et la prise en charge de l'infarctus du myocarde ou l'hypertension artérielle (Pitt *et al.* 1999, 2003; Lam *et al.* 2006). La contribution de HuR au développement de l'hypertension a été récemment mise en évidence par les travaux de Paukku *et al.*, notamment dans le cas du diabète de type 2, où l'hyperinsulinisme stimule le transfert nucléo-cytoplasmique de HuR, qui se lie à la région 3'UTR du transcrite du récepteur ATR1 et augmente sa stabilité et ainsi l'expression membranaire du récepteur ATR1 dans les cellules cardiaques et rénales. Dans la mesure où l'angiotensine II active le récepteur ATR1, cela conduit au remodelage de la matrice extracellulaire impliqué dans le développement de l'hypertension artérielle (Paukku *et al.* 2012). Le diabète de type 2 pourrait ainsi s'accompagner d'une hyperactivation de la voie minéralocorticoïde, du fait de la

relocalisation cytoplasmique de HuR, responsable la surexpression rénale du MR qui participe au développement de la néphropathie diabétique (Guo *et al.* 2006).

Conséquences fonctionnelles de l'épissage du transcrit MR et de l'expression du variant 6 MR sur les signalisations minéralocorticoïde et glucocorticoïde

L'épissage alternatif est un processus clé touchant 95% des gènes chez l'homme et permettant entre autre, l'expansion du protéome chez les eucaryotes (Pan *et al.* 2008; Nilsen & Graveley 2010). Sa dérégulation conduit le plus souvent au développement de pathologies comme le cancer, les maladies chroniques rénales ou neurologiques (Oltean & Bates 2014; Chen & Weiss 2015; Stevens & Oltean 2016). Ceci pourrait s'expliquer notamment par la modification du rapport d'expression relative de différents variants d'épissage d'un même gène (Douglas & Wood 2011; Fredericks *et al.* 2015). Nous pourrions émettre l'hypothèse selon laquelle l'augmentation significative du variant 6 MR murin, en réduisant l'activité transcriptionnelle du MR sauvage, participerait au développement de résistance partielle à l'aldostérone, à l'image du variant GR β , capable de s'hétérodimériser avec l'isoforme GR α dont l'activité transactivatrice est inhibée, mécanisme évoqué dans l'asthme insensible à l'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes (Leung *et al.* 1997). Il faudra cependant confirmer l'existence du variant 6 MR chez l'homme, analyser son patron d'expression tissulaire et caractériser ses propriétés fonctionnelles.

La mise en évidence du variant 6 MR dans de nombreux tissus cibles du MR chez la souris, en dehors de confirmer l'existence des mécanismes post-transcriptionnels cellulaires conservés, ouvre sur de nouvelles interrogations quant au rôle physiologique ou physiopathologique potentiel de ce variant d'épissage 6 MR dans les cellules cibles de l'aldostérone et plus globalement sur la signalisation minéralocorticoïde. En particulier, on peut s'interroger sur la signification de la surexpression relative de ce variant 6 MR au niveau rénal dans des conditions d'hypertonie. Des études antérieures avaient déjà rapporté l'existence de plusieurs variants du MR, dont l'expression était relativement ubiquitaire (rein, cœur, cerveau, poumon, foie, surrénales) (Bloem *et al.* 1995; Wickert *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2000; Zennaro *et al.* 2001). Parmi ces variants d'épissage, seul, le variant 5,6 MR identifié chez l'homme, semblait capable de moduler la signalisation corticostéroïde. En effet, ce variant, qui ne possède plus de LBD, conserve sa capacité à interagir avec l'ADN (*via* les GRE), à recruter des coactivateurs et surtout à potentialiser l'activité transcriptionnelle du hMR et hGR. La localisation majoritairement nucléaire du variant 6 MR chez la souris laisse présager un mécanisme d'action relativement similaire, notamment une interaction fonctionnelle directe sur des cibles chromatiniennes, comme l'attestent les propriétés transactivatrices basales, indépendantes du ligand de ce variant

dépissage. L'étude de l'impact fonctionnel du variant 6 MR, possiblement répressif, sur la signalisation relayée par le GR, pourrait se révéler particulièrement pertinente, en particulier dans certaines cellules cibles co-exprimant le MR et le GR.

En effet, ces deux récepteurs MR et GR ont des mécanismes d'action extrêmement proches. Premièrement, ils dérivent d'un récepteur ancestral commun (Bridgham *et al.* 2006), et présentent une organisation structurale et fonctionnelle superposable. D'autre part, la forte homologie de leur DBD (94%) (Arriza *et al.* 1987) leur permet d'interagir avec des séquences génomiques régulatrices en *cis*, au moins partiellement identiques. Ces deux récepteurs stéroïdiens semblent également capables de recruter des corégulateurs communs (NCoR1, SMRT, ELL, NF-YC) (Pascual-Le Tallec *et al.* 2005; Murai-Takeda *et al.* 2010; Kadmiel & Cidlowski 2013) et donc d'initier la transcription de gènes cibles communs tels que ENaC et Gilz (Nguyen Dinh Cat *et al.* 2009; Kadmiel & Cidlowski 2013). De plus, ils partagent un ligand commun le cortisol. Cette hormone glucocorticoïde se lie au MR et au GR. Dans les tissus non épithéliaux n'exprimant pas la 11 HSD2 tels que le cœur, le tissu adipeux ou bien encore le cerveau (cf chapitre 3.5), le ligand naturel du MR est donc le cortisol.

Au-delà de l'expression tissulaire commune du GR et du MR (rein, colon, poumon, tissu adipeux, macrophages, cerveau), ils assurent de nombreux rôles parfois opposés. On peut citer les travaux de Leroy *et al.*, qui ont démontré que dans la même cellule rénale, le MR une fois activé par l'aldostérone stimule la voie pro-inflammatoire NF- κ B alors que le GR déclenchait une réponse anti-inflammatoire suite à l'activation du GR par la dexaméthasone (un analogue du cortisol) (Leroy *et al.* 2009). Cependant, ces deux voies de signalisation corticostéroïde peuvent avoir dans le même tissu une fonction commune, comme par exemple, l'induction de la transcription des sous-unités α et β au niveau du colon distal par l'aldostérone et les glucocorticoïdes, ce qui suggère l'action probable des deux récepteurs dans la réabsorption sodée au niveau du colon (Bergann *et al.* 2011).

Au niveau rénal, malgré un patron d'expression du MR et du GR relativement proche (Ackermann *et al.* 2010; Rossier *et al.* 2013), les effets propres à la voie glucocorticoïde dans la réabsorption sodée ne sont pas clairement établis. En effet, l'utilisation de modèle dont le MR a été inactivé spécifiquement dans le néphron, ne conduit pas à une démonstration claire de l'effet compensatoire de l'absence du MR par le GR (Canonica *et al.* 2016). De plus, l'administration pendant 7 jours de dexaméthasone chez le rat n'a pas conduit à l'augmentation de l'expression de ENaC ni à une augmentation du transport de sodium sur le modèle de tubules collecteurs « ouverts » (Frindt & Palmer 2012).

La démonstration d'une interaction avec le GR ou d'un effet répressif du variant 6 MR pourrait se révéler intéressante d'un point de vue thérapeutique afin de réduire sélectivement les voies de signalisation MR et GR lorsqu'elles sont suractivées.

Action des miRNA et des RBP Tis11b et HuR dans les autres tissus exprimant le MR

Les mécanismes post-transcriptionnels, que nous avons identifiés dans le rein, sont susceptibles d'être également opérationnels dans les autres tissus, qui expriment le MR.

Il est vraisemblable que le stress osmotique ne prévale pas dans ces autres cellules cibles mais, nous pouvons formuler l'hypothèse que d'autres stimuli soient également des effecteurs de ces mécanismes post-transcriptionnels, comme cela a été décrit pour la protéine HuR avec le stress oxydatif, la déplétion énergétique ou encore l'action d'agents endogènes tels que les cytokines, les hormones ou les médiateurs de l'inflammation (TNF α , COX-2, IL8) (Doller *et al.* 2008). L'expression de la protéine Tis11b est modulée *via* l'action de mitogènes comme le TPA, l'insuline ou des conditions de stress cellulaire qui vont induire rapidement son expression (Baou *et al.* 2009). En effet, la cellule eucaryote est soumise à de nombreux stress cellulaires. Pour répondre et survivre au stress, la cellule module rapidement l'expression de certains gènes clés (facteurs anti-apoptotique, anti-inflammatoire). A ce titre, les régulateurs post-transcriptionnels (RBP et miARN) constituent un moyen rapide d'induire une réponse cellulaire adaptée. On peut citer l'exemple du stress hypoxique pour les cellules endothéliales. La réduction de l'oxygène sanguin conduit à la modification de l'expression du facteur HIF1 α par la protéine TTP, un membre de la famille Tis11 (Chamboredon *et al.* 2011). Ce mécanisme pourrait être particulièrement relevant dans certaines cellules minéralocorticoïde-sensibles, comme par exemple, la cellule musculaire et la cellule cardiaque après une ischémie/reperfusion (Thomas & Lieberman 2013; Beiter *et al.* 2015). L'expression des miARN est également modulée suite à un stress cellulaire. On peut citer l'exemple des membres de la famille miR-15 dont l'expression cardiaque est augmentée lors d'une ischémie/reperfusion et qui, en ciblant Bcl2, un facteur anti-apoptotique, participent à la régulation de l'apoptose cellulaire (Thomas & Lieberman 2013).

De nombreux autres exemples rapportent, l'arrêt du processus de épissage ou de traduction lors d'un stress. En effet, certains stress cellulaires modulent le fonctionnement de RBP impliquées dans les processus de épissage tels que hnRNP A1. En effet, le choc thermique va influencer l'action de ce facteur de épissage, favorisant la rétention d'intron, alors qu'à l'inverse, le stress osmotique (*via* l'activation de p38-MAPK) conduit à l'altération de l'épissage (Thomas & Lieberman 2013).

De manière intéressante, miR-30b qui avait été identifié par l'approche TLDA (3^e Partie des Résultats), vient d'être récemment associé à la thermogenèse et est impliqué dans le phénomène de brunissement (beiging) de la cellule adipocytaire, par son action répressive sur l'expression du corépresseur RIP140 (Hu *et al.* 2015). Le MR assure notamment des fonctions dans le métabolisme énergétique et dans le tissu adipeux (Kuhn & Lombès 2013b). L'ensemble de ces données démontre qu'il serait intéressant d'élargir l'étude et la caractérisation de ces mécanismes post-transcriptionnels à l'ensemble des segments néphroniques (podocytes et cellules mésangiales) mais aussi aux autres cellules cibles exprimant le MR.

L'ensemble de mon travail de thèse a incontestablement contribué à préciser les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression du MR. Nous avons démontré l'importance de ces mécanismes, leur impact sur la cellule rénale principale et le retentissement fonctionnel majeur sur la signalisation minéralocorticoïde dans le rein et la sensibilité à l'action de l'aldostérone avec ses conséquences sur la balance hydrosodée. Les interactions entre miARN et RBP sont complexes et doivent encore être mieux caractérisées. En effet, l'action des miARN et/ou des RBP sur leurs transcrits cibles peut moduler la structure secondaire du transcrit prévenant ou exposant le site de liaison aux différents acteurs du contrôle post-transcriptionnel (Lebedeva *et al.* 2011; Srikantan *et al.* 2012; Mukherjee *et al.* 2014). Ceci pourrait intervenir dans l'étiopathogénie de nombreuses maladies dans lesquelles l'expression du MR est modulée et où les régulateurs post-transcriptionnels pourraient agir de façon synergique, complémentaire ou antagoniste.

CONCLUSION GENERALE

L'aldostérone et son récepteur spécifique, le MR, jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la balance hydrosodée et de la pression artérielle en agissant principalement au niveau rénal sur le tubule distal. Il est maintenant établi que le MR assure aussi de nombreuses fonctions dans divers tissus épithéliaux et non épithéliaux. On peut citer, par exemple, son implication dans les processus de mémorisation ou de contrôle de l'appétit sodé dans le système nerveux central, ou encore son rôle pro-adipogénique et anti-thermogénique dans l'adipocyte brun (Viengchareun *et al.* 2007). Une modification de l'expression du MR et donc une altération de la signalisation relayée par le MR, qui lui est associée, participe à l'apparition ou au développement de diverses pathologies (PHA I, hypertension artérielle, fibrose cardiaque, syndrome métabolique). Cette observation souligne la nécessité d'une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de ce facteur de transcription activé par l'aldostérone.

Voilà une vingtaine d'années que les travaux pionniers de notre laboratoire ont permis de caractériser le promoteur proximal P1 et distal P2 du gène *NR3C2* codant le MR. Cette régulation transcriptionnelle, par utilisation de ces deux promoteurs alternatifs, représente un premier niveau de contrôle essentiel pour l'expression de ce facteur de transcription (Zennaro *et al.* 1996; Le Menuet *et al.* 2000; Munier *et al.* 2010). Plus tard, notre équipe et d'autres laboratoires ont montré que des modifications post-traductionnelles de la protéine MR (phosphorylation, sumoylation, ubiquitylation, acétylation) sont capables de moduler l'activité et la demi-vie du MR (Tallec *et al.* 2003; Faresse *et al.* 2012; Shibata *et al.* 2013; Faresse 2014). Ces mécanismes de régulation ajoutent donc un deuxième niveau de complexité dans le contrôle tissu-spécifique et développemental de la signalisation minéralocorticoïde. Cependant, ces deux niveaux de régulation ne permettaient pas de rendre compte des variations d'expression du MR en fonction des segments tubulaires, ni d'intégrer les mécanismes qui sous-tendent la modification de la signalisation minéralocorticoïde en réponse aux modifications rapides de l'osmolarité luminale, qui prévalent dans les segments néphroniques. Par ailleurs, ils ne permettaient pas non plus d'appréhender les mécanismes responsables de l'altération de l'expression du MR, observée dans certaines situations physiopathologiques.

L'établissement de la lignée immortalisée KC3AC1, des cellules principales du canal collecteur cortical, qui expriment de façon endogène un MR fonctionnel, nous a permis de caractériser de nouveaux mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR. Ceci représente un aspect original et inédit pour un récepteur nucléaire. Nous avons ainsi démontré l'impact des protéines de liaison à l'ARN (Tis11b et HuR) mais aussi le rôle potentiel des miARN dans le contrôle de l'expression rénale du MR en lien avec les

variations intenses de tonicité luminale, en particulier, celles générées par le gradient corticopapillaire.

Ainsi, mon travail de Thèse a contribué, de façon importante, à l'identification d'un niveau supplémentaire de contrôle de la régulation de l'expression génique. Il a notamment permis de mieux comprendre l'expression différentielle du MR le long du néphron mais également d'apporter des connaissances nouvelles sur les mécanismes qui contrôlent la sensibilité à l'action rénale de l'aldostérone. Nos données expliquent, en particulier, les phénomènes rapides d'adaptation de la cellule rénale, qui reposent, notamment, sur l'action combinée et complémentaire des protéines de liaison à l'ARN et des miARN. Enfin, la découverte d'un nouveau variant d'épissage du MR, qui exerce un effet dominant négatif sur la signalisation minéralocorticoïde relayée par le récepteur sauvage, ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de résistance aux minéralocorticoïdes.

Au total, l'ensemble de ces travaux sur les mécanismes de régulation de l'expression rénale du MR démontrent que de nombreux événements vont influencer « la vie du récepteur » avant que ce dernier ne relaye les effets de son ligand sur ses cibles génomiques. Les régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles jouent donc un rôle déterminant dans l'expression et l'activité du récepteur mais aussi dans le degré de la réponse hormonale.

Dans ce contexte, il nous paraissait important de comprendre et de décortiquer ces mécanismes de régulation de l'expression du MR car des perturbations de ces mécanismes régulateurs essentiels à l'action du MR, pourraient être impliquées dans l'étiopathogénie de certaines maladies rénales chroniques (tubulopathies ou glomérulopathies, diabète insipide néphrogénique, désordres des équilibres électrolytiques, diurèse osmotique), ou systémiques (hypertension artérielle) ou encore dans les syndromes de résistance minéralocorticoïde physiologiques (nouveau-né) ou pathologiques (acquises, retard de croissance intra-utérin).

Par ailleurs, il est vraisemblable, que des modifications de ces mécanismes fins de régulation de l'expression de ce facteur de transcription, puissent rentrer dans le contrôle de la programmation fœtale. Ainsi, une altération du développement et de la maturation fonctionnelle rénale pourra être responsable à long terme de l'émergence à l'âge adulte de pathologies rénales dégénératives ou de susceptibilités particulières à d'autres facteurs déclenchants pathogéniques. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression rénale du MR nous semblait particulièrement pertinent car ce travail pourrait déboucher sur de nouvelles perspectives pharmacologiques de modulation de la

signalisation minéralocorticoïde dans la prise en charge des néphropathies évolutives (protéinurie, néphropathie diabétique, insuffisance rénale), par exemple.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelmohsen K, Pullmann R, Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, Blethrow JD, Walker M, Shubert J, Gillespie DA *et al.*, 2007, Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Molecular Cell*, 25; 543–557.
- Abdelmohsen K, Tominaga-Yamanaka K, Srikantan S, Yoon J-H, Kang M-J & Gorospe M, 2012, RNA-binding protein AUF1 represses Dicer expression. *Nucleic Acids Research*, 40; 11531–11544.
- Ackermann D, Gresko N, Carrel M, Loffing-Cueni D, Habermehl D, Gomez-Sanchez C, Rossier BC & Loffing J, 2010, In vivo nuclear translocation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat kidney: differential effect of corticosteroids along the distal tubule. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 299; F1473-1485.
- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W & Bartel DP, 2015, Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4.
- Al-Ahmadi W, Al-Ghamdi M, Al-Haj L, Al-Saif M & Khabar KSA, 2009, Alternative polyadenylation variants of the RNA binding protein, HuR: abundance, role of AU-rich elements and auto-Regulation. *Nucleic Acids Research*, 37; 3612–3624.
- Alzamora R, Marusic ET, Gonzalez M & Michea L, 2003, Nongenomic effect of aldosterone on Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrinology*, 144; 1266–1272.
- Amador CA, Barrientos V, Peña J, Herrada AA, González M, Valdés S, Carrasco L, Alzamora R, Figueroa F, Kalergis AM *et al.*, 2014, Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 63; 797–803.
- Amazit L, Le Billan F, Kolkhof P, Lamribet K, Viengchareun S, Fay MR, Khan JA, Hillisch A, Lombès M, Rafestin-Oblin M-E *et al.*, 2015, Finerenone Impedes Aldosterone-dependent Nuclear Import of the Mineralocorticoid Receptor and Prevents Genomic Recruitment of Steroid Receptor Coactivator-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 290; 21876–21889.
- Antic D & Keene JD, 1997, Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. *American Journal of Human Genetics*, 61; 273–278.
- Arechavala-Gomez V, Khoo B & Aartsma-Rus A, 2014, Splicing modulation therapy in the treatment of genetic diseases. *The Application of Clinical Genetics*, 7; 245–252.
- Armani A, Cinti F, Marzolla V, Morgan J, Cranston GA, Antelmi A, Carpinelli G, Canese R, Pagotto U, Quarta C *et al.*, 2014, Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28; 3745–3757.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE & Evans RM, 1987, Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 237; 268–275.
- Artunc F & Lang F, 2014, Mineralocorticoid and SGK1-sensitive inflammation and tissue fibrosis. *Nephron. Physiology*, 128; 35–39.
- Artunc F, Amann K, Nasir O, Friedrich B, Sandulache D, Jahovic N, Risler T, Vallon V, Wulff P, Kuhl D *et al.*, 2006, Blunted DOCA/high salt induced albuminuria and renal tubulointerstitial damage in gene-targeted mice lacking SGK1. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 84; 737–746.
- Atlas SA, 2007, The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy: JMCP*, 13; 9–20.
- Auboeuf D, Batsché E, Dutertre M, Muchardt C & O'Malley BW, 2007, Coregulators: transducing signal from transcription to alternative splicing. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 18; 122–129.

- Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP & Blelloch R, 2008, Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development*, 22; 2773–2785.
- Bachmann S, Bostanjoglo M, Schmitt R & Ellison DH, 1999, Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects. *Anatomy and Embryology*, 200; 447–468.
- Bahr V, Bumke-Vogt C, Gotze J, Pfeiffer AFH & Diederich S, 2004, Function of human mineralocorticoid receptor splice variant. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 151; 295.
- Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD & Miura MT, 2007, Nuclear receptor structure: implications for function. *Annual Review of Physiology*, 69; 201–220.
- Bakheet T, Williams BRG & Khabar KSA, 2006, ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Research*, 34; D111-114.
- Bandulik S, Penton D, Barhanin J & Warth R, 2010, TASK1 and TASK3 potassium channels: determinants of aldosterone secretion and adrenocortical zonation. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme*, 42; 450–457.
- Bankir L, Bichet DG & Bouby N, 2010, Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 299; F917-928.
- Baou M, Jewell A & Murphy JJ, 2009, TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2009; 634520.
- Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, Mangelsdorf DJ & Evans RM, 2005, A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19; 2466–2477.
- Barker PM, Nguyen MS, Gatzky JT, Grubb B, Norman H, Hummler E, Rossier B, Boucher RC & Koller B, 1998, Role of gammaENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism. *The Journal of Clinical Investigation*, 102; 1634–1640.
- Barlet-Bas C, Cheval L, Khadouri C, Marsy S & Doucet A, 1990, Difference in the Na affinity of Na(+)-K(+)-ATPase along the rabbit nephron: modulation by K. *The American Journal of Physiology*, 259; F246-250.
- Barrios-García T, Gómez-Romero V, Tecalco-Cruz Á, Valadéz-Graham V & León-Del-Río A, 2016, Nuclear tristetraprolin acts as a corepressor of multiple steroid nuclear receptors in breast cancer cells. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 7; 20–26.
- Bartel DP, 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116; 281–297.
- Bartel DP, 2009, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136; 215–233.
- Bassett MH, White PC & Rainey WE, 2004, The regulation of aldosterone synthase expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217; 67–74.
- Beck AR, Medley QG, O'Brien S, Anderson P & Streuli M, 1996, Structure, tissue distribution and genomic organization of the murine RRM-type RNA binding proteins TIA-1 and TIAR. *Nucleic Acids Research*, 24; 3829–3835.
- Béguin P, Crambert G, Guennoun S, Garty H, Horisberger JD & Geering K, 2001, CHIF, a member of the FXFD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *The EMBO Journal*, 20; 3993–4002.
- Beiter T, Hoene M, Prenzler F, Mooren FC, Steinacker JM, Weigert C, Nieß AM & Munz B, 2015, Exercise, skeletal muscle and inflammation: ARE-binding proteins as key regulators in inflammatory and adaptive networks. *Exercise Immunology Review*, 21; 42–57.
- Bell SE, Sanchez MJ, Spasic-Boskovic O, Santalucia T, Gambardella L, Burton GJ, Murphy JJ, Norton JD, Clark AR & Turner M, 2006, The RNA binding protein Zfp3611 is required for normal

- vascularisation and post-transcriptionally regulates VEGF expression. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235; 3144–3155.
- Beltrami C, Clayton A, Phillips AO, Fraser DJ & Bowen T, 2012, Analysis of urinary microRNAs in chronic kidney disease. *Biochemical Society Transactions*, 40; 875–879.
- Bergann T, Fromm A, Borden SA, Fromm M & Schulzke JD, 2011, Glucocorticoid receptor is indispensable for physiological responses to aldosterone in epithelial Na⁺ channel induction via the mineralocorticoid receptor in a human colonic cell line. *European Journal of Cell Biology*, 90; 432–439.
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R & Schütz G, 1998, Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95; 9424–9429.
- Bergmann A, Eulenberg C, Wellner M, Rolle S, Luft F & Kettritz R, 2010, Aldosterone abrogates nuclear factor kappaB-mediated tumor necrosis factor alpha production in human neutrophils via the mineralocorticoid receptor. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 55; 370–379.
- Berl T, 2009, How do kidney cells adapt to survive in hypertonic inner medulla? *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 120; 389–401.
- Bhalla V, Soundararajan R, Pao AC, Li H & Pearce D, 2006, Disinhibitory pathways for control of sodium transport: regulation of ENaC by SGK1 and GILZ. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 291; F714–721.
- Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D & Cole TJ, 2001, The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*, 142; 1587–1594.
- Bichet DG & Bockenhauer D, 2016, Genetic forms of nephrogenic diabetes insipidus (NDI): Vasopressin receptor defect (X-linked) and aquaporin defect (autosomal recessive and dominant). *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30; 263–276.
- Binart N, Lombes M, Rafestin-Oblin ME & Baulieu EE, 1991, Characterization of human mineralocorticosteroid receptor expressed in the baculovirus system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88; 10681–10685.
- Bizuayehu TT & Babiak I, 2014, MicroRNA in teleost fish. *Genome Biology and Evolution*, 6; 1911–1937.
- Black BE, Holaska JM, Rastinejad F & Paschal BM, 2001, DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Current Biology: CB*, 11; 1749–1758.
- Bledsoe RK, Madauss KP, Holt JA, Apolito CJ, Lambert MH, Pearce KH, Stanley TB, Stewart EL, Trump RP, Willson TM *et al.*, 2005, A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 280; 31283–31293.
- Bleich M, Warth R, Schmidt-Hieber M, Schulz-Baldes A, Hasselblatt P, Fisch D, Berger S, Kunzelmann K, Kriz W, Schütz G *et al.*, 1999, Rescue of the mineralocorticoid receptor knock-out mouse. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 438; 245–254.
- Bloem LJ, Guo C & Pratt JH, 1995, Identification of a splice variant of the rat and human mineralocorticoid receptor genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 55; 159–162.
- Brennan CM & Steitz JA, 2001, HuR and mRNA stability. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 58; 266–277.
- Brewer G, 1991, An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 11; 2460–2466.

- Bridgham JT, Carroll SM & Thornton JW, 2006, Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science (New York, N.Y.)*, 312; 97–101.
- Brogna S, McLeod T & Petric M, 2016, The Meaning of NMD: Translate or Perish. *Trends in Genetics: TIG*, 32; 395–407.
- Brooks SA, Connolly JE & Rigby WFC, 2004, The role of mRNA turnover in the regulation of tristetraprolin expression: evidence for an extracellular signal-regulated kinase-specific, AU-rich element-dependent, autoregulatory pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172; 7263–7271.
- Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y & Farman N, 1999, Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 19); 3343–3352.
- Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM, Guerriero G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES & Litwack G, 1997, The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Receptors & Signal Transduction*, 7; 85–98.
- Bugaj V, Pochynyuk O & Stockand JD, 2009, Activation of the epithelial Na⁺ channel in the collecting duct by vasopressin contributes to water reabsorption. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 297; F1411-1418.
- Bulyanko YA & O'Malley BW, 2011, Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry. *Biochemistry*, 50; 313–328.
- Buratti E, Muro AF, Giombi M, Gherbassi D, Iaconig A & Baralle FE, 2004, RNA folding affects the recruitment of SR proteins by mouse and human polypurinic enhancer elements in the fibronectin EDA exon. *Molecular and Cellular Biology*, 24; 1387–1400.
- Burg MB, Ferraris JD & Dmitrieva NI, 2007, Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiological Reviews*, 87; 1441–1474.
- Butterworth MB, 2010, Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1802; 1166–1177.
- Butterworth MB, 2015, MicroRNAs and the regulation of aldosterone signaling in the kidney. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 308; C521-527.
- Callera GE, Montezano ACI, Yogi A, Tostes RC, He Y, Schiffrin EL & Touyz RM, 2005, c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 46; 1032–1038.
- Callera GE, Yogi A, Briones AM, Montezano ACI, He Y, Tostes RCA, Schiffrin EL & Touyz RM, 2011, Vascular proinflammatory responses by aldosterone are mediated via c-Src trafficking to cholesterol-rich microdomains: role of PDGFR. *Cardiovascular Research*, 91; 720–731.
- Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD & Rossier BC, 1994, Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 367; 463–467.
- Canonica J, Sergi C, Maillard M, Klusonova P, Odermatt A, Koesters R, Loffing-Cueni D, Loffing J, Rossier B, Frateschi S *et al.*, 2016, Adult nephron-specific MR-deficient mice develop a severe renal PHA-1 phenotype. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 468; 895–908.
- Cao L, Xie B, Yang X, Liang H, Jiang X, Zhang D, Xue P, Chen D & Shao Z, 2015, MiR-324-5p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion by Counteracting ECM Degradation through Post-Transcriptionally Downregulating ETS1 and SP1. *PloS One*, 10; e0133074.
- Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M & Zennaro M-C, 2007, Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21; 2185–2194.
- Castrén M & Damm K, 1993, A functional promoter directing expression of a novel type of rat mineralocorticoid receptor mRNA in brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 5; 461–466.

- Cavasin MA, Liao T-D, Yang X-P, Yang JJ & Carretero OA, 2007, Decreased endogenous levels of Ac-SDKP promote organ fibrosis. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 50; 130–136.
- Chamboredon S, Ciais D, Desroches-Castan A, Savi P, Bono F, Feige J-J & Cherradi N, 2011, Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22; 3366–3378.
- Chang S-H, Elemento O, Zhang J, Zhuang ZW, Simons M & Hla T, 2014, ELAVL1 regulates alternative splicing of eIF4E transporter to promote postnatal angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111; 18309–18314.
- Cheek DB & Perry JW, 1958, A salt wasting syndrome in infancy. *Archives of Disease in Childhood*, 33; 252–256.
- Chen CY & Shyu AB, 1995, AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 20; 465–470.
- Chen J & Weiss WA, 2015, Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene*, 34; 1–14.
- Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F & Pearce D, 1999, Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96; 2514–2519.
- Chen S, Grigsby CL, Law CS, Ni X, Nekrep N, Olsen K, Humphreys MH & Gardner DG, 2009, Tonicity-dependent induction of Sgk1 expression has a potential role in dehydration-induced natriuresis in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 119; 1647–1658.
- Cherradi N & Capponi AM, 1998, The acute regulation of mineralocorticoid biosynthesis: scenarios for the StAR system. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 9; 412–418.
- Cherradi N, Lejczak C, Desroches-Castan A & Feige J-J, 2006, Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20; 916–930.
- Christ M, Eisen C, Aktas J, Theisen K & Wehling M, 1993, The inositol-1,4,5-trisphosphate system is involved in rapid effects of aldosterone in human mononuclear leukocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77; 1452–1457.
- Christ M, Sippel K, Eisen C & Wehling M, 1994, Non-classical receptors for aldosterone in plasma membranes from pig kidneys. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 99; R31-34.
- Ciafrè SA & Galardi S, 2013, microRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer. *RNA Biology*, 10; 935–942.
- Ciais D, Cherradi N & Feige J-J, 2013, Multiple functions of tristetraprolin/TIS11 RNA-binding proteins in the regulation of mRNA biogenesis and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 70; 2031–2044.
- Condon JC, Pezzi V, Drummond BM, Yin S & Rainey WE, 2002, Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology*, 143; 3651–3657.
- Connell JMC & Davies E, 2005, The new biology of aldosterone. *The Journal of Endocrinology*, 186; 1–20.
- Connell JMC, MacKenzie SM, Freel EM, Fraser R & Davies E, 2008, A lifetime of aldosterone excess: long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function. *Endocrine Reviews*, 29; 133–154.
- Cornier M-A, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H & Eckel RH, 2008, The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 29; 777–822.
- Corvol P, Oblin ME, Degoulet P, Fressinaud P & Menard J, 1977, Effect of acute potassium loading on plasma renin and on urinary aldosterone in rats. *Endocrinology*, 100; 1008–1013.

- Couette B, Fagart J, Jalaguier S, Lombes M, Souque A & Rafestin-Oblin ME, 1996, Ligand-induced conformational change in the human mineralocorticoid receptor occurs within its hetero-oligomeric structure. *The Biochemical Journal*, 315 (Pt 2); 421–427.
- Couloigner V, Fay M, Djelidi S, Farman N, Escoubet B, Runembert I, Sterkers O, Friedlander G & Ferrary E, 2001, Location and function of the epithelial Na channel in the cochlea. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 280; F214-222.
- Coulter CL & Jaffe RB, 1998, Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology*, 139; 5144–5150.
- Crambert G, Hernandez T, Lamouroux C, Roth I, Dizin E, Martin P-Y, Féraille E & Hasler U, 2014, Epithelial sodium channel abundance is decreased by an unfolded protein response induced by hyperosmolality. *Physiological Reports*, 2.
- Creemers EE, Tijssen AJ & Pinto YM, 2012, Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation Research*, 110; 483–495.
- Dantzler WH, Layton AT, Layton HE & Pannabecker TL, 2014, Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 9; 1781–1789.
- Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ & Yamamoto KR, 1998, Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & Development*, 12; 3343–3356.
- Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA & Barrett PQ, 2008, TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105; 2203–2208.
- De Kloet ER & Derijk R, 2004, Signaling pathways in brain involved in predisposition and pathogenesis of stress-related disease: genetic and kinetic factors affecting the MR/GR balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032; 14–34.
- Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, van Os CH & van Oost BA, 1994, Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science (New York, N.Y.)*, 264; 92–95.
- Dember LM, Kim ND, Liu KQ & Anderson P, 1996, Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. *The Journal of Biological Chemistry*, 271; 2783–2788.
- Deng W-B, Tian Z, Liang X-H, Wang B-C, Yang F & Yang Z-M, 2013, Progesterone regulation of Na/K-ATPase β 1 subunit expression in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Theriogenology*, 79; 1196–1203.
- Derfoul A, Robertson NM, Hall DJ & Litwack G, 2000, The N-terminal domain of the mineralocorticoid receptor modulates both mineralocorticoid receptor- and glucocorticoid receptor-mediated transactivation from Na/K ATPase beta1 target gene promoter. *Endocrine*, 13; 287–295.
- Després J-P & Lemieux I, 2006, Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444; 881–887.
- Devuyst O, 2008, Salt wasting and blood pressure. *Nature Genetics*, 40; 495–496.
- DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI & Knepper MA, 1994, Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91; 8984–8988.
- Doller A, Pfeilschifter J & Eberhardt W, 2008, Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cellular Signalling*, 20; 2165–2173.
- Doucet A & Katz AI, 1981, Mineralocorticoid receptors along the nephron: [3H]aldosterone binding in rabbit tubules. *The American Journal of Physiology*, 241; F605-611.
- Douglas AGL & Wood MJA, 2011, RNA splicing: disease and therapy. *Briefings in Functional Genomics*, 10; 151–164.

- Doyle M & Jantsch MF, 2002, New and old roles of the double-stranded RNA-binding domain. *Journal of Structural Biology*, 140; 147–153.
- Draper N & Stewart PM, 2005, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *The Journal of Endocrinology*, 186; 251–271.
- Dreyfuss G, Swanson MS & Piñol-Roma S, 1988, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends in Biochemical Sciences*, 13; 86–91.
- Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet JP & Rossier BC, 1994, Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *The Journal of Cell Biology*, 127; 1907–1921.
- Dutertre M, Chakrama FZ, Combe E, Desmet F-O, Mortada H, Polay Espinoza M, Gratadou L & Auboeuf D, 2014, A recently evolved class of alternative 3'-terminal exons involved in cell cycle regulation by topoisomerase inhibitors. *Nature Communications*, 5; 3395.
- Duval D & Funder JW, 1974, The binding of tritiated aldosterone in the rat liver cytosol. *Endocrinology*, 94; 575–579.
- Edinger RS, Coronello C, Bodnar AJ, Labarca M, Bhalla V, LaFramboise WA, Benos PV, Ho J, Johnson JP & Butterworth MB, 2014, Aldosterone regulates microRNAs in the cortical collecting duct to alter sodium transport. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25; 2445–2457.
- Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER & Monder C, 1988, Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet (London, England)*, 2; 986–989.
- Eggert M, Möws CC, Tripiet D, Arnold R, Michel J, Nickel J, Schmidt S, Beato M & Renkawitz R, 1995, A fraction enriched in a novel glucocorticoid receptor-interacting protein stimulates receptor-dependent transcription in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 270; 30755–30759.
- Elvira-Matelo E, Zhou X, Farman N, Beaurain G, Henrion-Caude A, Hadchouel J & Jeunemaitre X, 2010, Regulation of WNK1 expression by miR-192 and aldosterone. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21; 1724–1731.
- Elvira-Matelo E, Jeunemaitre X & Hadchouel J, 2011, Regulation of ion transport by microRNAs. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20; 541–546.
- Emmons J, Townley-Tilson WHD, Deleault KM, Skinner SJ, Gross RH, Whitfield ML & Brooks SA, 2008, Identification of TTP mRNA targets in human dendritic cells reveals TTP as a critical regulator of dendritic cell maturation. *RNA (New York, N.Y.)*, 14; 888–902.
- Encío IJ & Detera-Wadleigh SD, 1991, The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 266; 7182–7188.
- Eulalio A, Huntzinger E & Izaurralde E, 2008, Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 132; 9–14.
- Fagart J, Wurtz JM, Souque A, Hellal-Levy C, Moras D & Rafestin-Oblin ME, 1998, Antagonism in the human mineralocorticoid receptor. *The EMBO Journal*, 17; 3317–3325.
- Fagart J, Seguin C, Pinon GM & Rafestin-Oblin M-E, 2005, The Met852 residue is a key organizer of the ligand-binding cavity of the human mineralocorticoid receptor. *Molecular Pharmacology*, 67; 1714–1722.
- Falkenstein E, Christ M, Feuring M & Wehling M, 2000, Specific nongenomic actions of aldosterone. *Kidney International*, 57; 1390–1394.
- Fan XC & Steitz JA, 1998, HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95; 15293–15298.
- Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Haley LL, Henry WM, Nowak NJ & Shows TB, 1989, The human mineralocorticoid receptor gene (MLR) is located on chromosome 4 at q31.2. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 52; 83–84.

- Faresse N, 2014, Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143; 334–342.
- Faresse N, Ruffieux-Daidie D, Salamin M, Gomez-Sanchez CE & Staub O, 2010, Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 299; F1462-1472.
- Faresse N, Vitagliano J-J & Staub O, 2012, Differential ubiquitylation of the mineralocorticoid receptor is regulated by phosphorylation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26; 4373–4382.
- Farman N & Rafestin-Oblin ME, 2001, Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 280; F181-192.
- Farman N, Talbot CR, Boucher R, Fay M, Canessa C, Rossier B & Bonvalet JP, 1997, Noncoordinated expression of alpha-, beta-, and gamma-subunit mRNAs of epithelial Na⁺ channel along rat respiratory tract. *The American Journal of Physiology*, 272; C131-141.
- Fejes-Tóth G & Náray-Fejes-Tóth A, 2007, Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: clues to cardiac remodeling? *Endocrinology*, 148; 1502–1510.
- Fenton RA & Knepper MA, 2007, Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiological Reviews*, 87; 1083–1112.
- Feraille E & Dizin E, 2016, Coordinated Control of ENaC and Na⁺,K⁺-ATPase in Renal Collecting Duct. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*.
- Férraille E & Doucet A, 2001, Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiological Reviews*, 81; 345–418.
- Fernandes-Rosa FL, Hubert E-L, Fagart J, Tchitchek N, Gomes D, Jouanno E, Benecke A, Rafestin-Oblin M-E, Jeunemaitre X, Antonini SR *et al.*, 2011, Mineralocorticoid receptor mutations differentially affect individual gene expression profiles in pseudohypoaldosteronism type 1. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96; E519-527.
- Ferrari P, Sansonnens A, Dick B & Frey FJ, 2001, In vivo 11beta-HSD-2 activity: variability, salt-sensitivity, and effect of licorice. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 38; 1330–1336.
- Filichkin SA, Priest HD, Givan SA, Shen R, Bryant DW, Fox SE, Wong W-K & Mockler TC, 2010, Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, 20; 45–58.
- Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC & Schild L, 1998, The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *The EMBO Journal*, 17; 344–352.
- Fischer K, Kelly SM, Watt K, Price NC & McEwan IJ, 2010, Conformation of the mineralocorticoid receptor N-terminal domain: evidence for induced and stable structure. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24; 1935–1948.
- Flynt AS, Thatcher EJ, Burkewitz K, Li N, Liu Y & Patton JG, 2009, miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos. *The Journal of Cell Biology*, 185; 115–127.
- Förch P, Puig O, Martínez C, Séraphin B & Valcárcel J, 2002, The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *The EMBO Journal*, 21; 6882–6892.
- Forman JJ, Legesse-Miller A & Collier HA, 2008, A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105; 14879–14884.
- Fredericks AM, Cygan KJ, Brown BA & Fairbrother WG, 2015, RNA-Binding Proteins: Splicing Factors and Disease. *Biomolecules*, 5; 893–909.
- Fries B, Heukeshoven J, Hauber I, Grüttner C, Stocking C, Kehlenbach RH, Hauber J & Chemnitz J, 2007, Analysis of nucleocytoplasmic trafficking of the HuR ligand APRIL and its influence on CD83 expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 282; 4504–4515.

- Frindt G & Palmer LG, 2012, Regulation of epithelial Na⁺ channels by adrenal steroids: mineralocorticoid and glucocorticoid effects. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 302; F20-26.
- Fu X-D & Ares M, 2014, Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews. Genetics*, 15; 689–701.
- Fuller PJ, 2015, Novel interactions of the mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 408; 33–37.
- Fuller PJ & Verity K, 1990, Mineralocorticoid receptor gene expression in the gastrointestinal tract: distribution and ontogeny. *Journal of Steroid Biochemistry*, 36; 263–267.
- Fuller PJ, Yao Y, Yang J & Young MJ, 2012, Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. *The Journal of Endocrinology*, 213; 15–24.
- Funder JW, Feldman D & Edelman IS, 1972, Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *Journal of Steroid Biochemistry*, 3; 209–218.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R & Smith AI, 1988, Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science (New York, N.Y.)*, 242; 583–585.
- Fuse H, Kitagawa H & Kato S, 2000, Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1). *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14; 889–899.
- Gaeggeler H-P, Gonzalez-Rodriguez E, Jaeger NF, Loffing-Cueni D, Norregaard R, Loffing J, Horisberger J-D & Rossier BC, 2005, Mineralocorticoid versus glucocorticoid receptor occupancy mediating aldosterone-stimulated sodium transport in a novel renal cell line. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16; 878–891.
- Galigniana MD, 1998, Native rat kidney mineralocorticoid receptor is a phosphoprotein whose transformation to a DNA-binding form is induced by phosphatases. *The Biochemical Journal*, 333 (Pt 3); 555–563.
- Galigniana MD, Erlejman AG, Monte M, Gomez-Sanchez C & Piwien-Pilipuk G, 2010, The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Molecular and Cellular Biology*, 30; 1285–1298.
- Gao FB & Keene JD, 1996, Hel-N1/Hel-N2 proteins are bound to poly(A)⁺ mRNA in granular RNP structures and are implicated in neuronal differentiation. *Journal of Cell Science*, 109 (Pt 3); 579–589.
- Ge J, Chang N, Zhao Z, Tian L, Duan X, Yang L & Li L, 2016, Essential Roles of RNA-binding Protein HuR in Activation of Hepatic Stellate Cells Induced by Transforming Growth Factor- β 1. *Scientific Reports*, 6; 22141.
- Geering K, 1991, The functional role of the beta-subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase. *FEBS Letters*, 285; 189–193.
- Geering K, 2006, FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 290; F241-250.
- Geering K, 2008, Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 17; 526–532.
- Geerling JC & Loewy AD, 2008, Central regulation of sodium appetite. *Experimental Physiology*, 93; 177–209.
- Geller DS, 2005, Mineralocorticoid resistance. *Clinical Endocrinology*, 62; 513–520.
- Geller DS, Rodriguez-Soriano J, Vallo Boado A, Schifter S, Bayer M, Chang SS & Lifton RP, 1998, Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nature Genetics*, 19; 279–281.

- Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, Meinke G, Tsai FT, Sigler PB & Lifton RP, 2000, Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science (New York, N.Y.)*, 289; 119–123.
- Geller DS, Zhang J, Zennaro M-C, Vallo-Boado A, Rodriguez-Soriano J, Furu L, Haws R, Metzger D, Botelho B, Karaviti L *et al.*, 2006, Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1: mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17; 1429–1436.
- Gerstberger S, Hafner M & Tuschl T, 2014, A census of human RNA-binding proteins. *Nature Reviews. Genetics*, 15; 829–845.
- Gervois P, Torra IP, Chinetti G, Grötzinger T, Dubois G, Fruchart JC, Fruchart-Najib J, Leitersdorf E & Staels B, 1999, A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor alpha splice variant with dominant negative activity. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13; 1535–1549.
- Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM & Anderson P, 2004, Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Molecular Biology of the Cell*, 15; 5383–5398.
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J & Dreyfuss G, 2008, RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters*, 582; 1977–1986.
- Gomez-Sanchez E & Gomez-Sanchez CE, 2014, The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Comprehensive Physiology*, 4; 965–994.
- Goodwin JE, Zhang J, Velazquez H & Geller DS, 2010, The glucocorticoid receptor in the distal nephron is not necessary for the development or maintenance of dexamethasone-induced hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394; 266–271.
- Gratacós FM & Brewer G, 2010, The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 1; 457–473.
- Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW *et al.*, 2011, The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 471; 473–479.
- Greenwood AK, Butler PC, White RB, DeMarco U, Pearce D & Fernald RD, 2003, Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology*, 144; 4226–4236.
- Griffiths-Jones S, 2006, miRBase: the microRNA sequence database. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 342; 129–138.
- Grossmann C & Gekle M, 2008, Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance. *Steroids*, 73; 973–978.
- Grossmann C & Gekle M, 2009, New aspects of rapid aldosterone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 308; 53–62.
- Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Krug AW & Gekle M, 2004, Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na⁺ reabsorption. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 286; F1226–1231.
- Grossmann C, Husse B, Mildenerger S, Schreier B, Schuman K & Gekle M, 2010, Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1803; 584–590.
- Grossmann C, Ruhs S, Langenbruch L, Mildenerger S, Strätz N, Schumann K & Gekle M, 2012, Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling. *Chemistry & Biology*, 19; 742–751.
- Guenther MG, Barak O & Lazar MA, 2001, The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Molecular and Cellular Biology*, 21; 6091–6101.
- Gueutin V, Deray G & Isnard-Bagnis C, 2012, [Renal physiology]. *Bulletin Du Cancer*, 99; 237–249.

- Guo C, Martinez-Vasquez D, Mendez GP, Toniolo MF, Yao TM, Oestreicher EM, Kikuchi T, Lapointe N, Pojoga L, Williams GH *et al.*, 2006, Mineralocorticoid receptor antagonist reduces renal injury in rodent models of types 1 and 2 diabetes mellitus. *Endocrinology*, 147; 5363–5373.
- Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P, Romero JR, Li J, Williams GH & Adler GK, 2008, Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation*, 117; 2253–2261.
- Guyton AC, 1991, Blood pressure control—special role of the kidneys and body fluids. *Science (New York, N.Y.)*, 252; 1813–1816.
- HafezQorani S, Lafzi A, de Bruin RG, van Zonneveld AJ, van der Veer EP, Son YA & Kazan H, 2016, Modeling the combined effect of RNA-binding proteins and microRNAs in post-transcriptional regulation. *Nucleic Acids Research*, 44; e83.
- Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C & Brown M, 1994, Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 264; 1455–1458.
- Hall TMT, 2005, Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15; 367–373.
- Han F, Ozawa H, Matsuda K, Nishi M & Kawata M, 2005, Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience Research*, 51; 371–381.
- Haning R, Tait JF, Tait SA & Williams GH, 1971, Stimulation of the conversion of corticosterone to aldosterone by rat adrenal glomerulosa cells and tissue. *The Journal of Endocrinology*, 49; xii–xiv.
- Hansson JH, Schild L, Lu Y, Wilson TA, Gautschi I, Shimkets R, Nelson-Williams C, Rossier BC & Lifton RP, 1995, A de novo missense mutation of the beta subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92; 11495–11499.
- Hanukoglu A, 1991, Type I pseudohypoaldosteronism includes two clinically and genetically distinct entities with either renal or multiple target organ defects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73; 936–944.
- Hartmann C, Corre-Menguy F, Boualem A, Jovanovic M & Lelandais-Brière C, 2004, [MicroRNAs: a new class of gene expression regulators]. *Médecine Sciences: M/S*, 20; 894–898.
- Harvey BJ, Condliffe S & Doolan CM, 2001, Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 16; 174–177.
- Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Goldberg S, Schermer B, Harfe BD, McManus MT, Benzing T & Miner JH, 2008, Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 19; 2150–2158.
- Hasler U, 2009, Controlled aquaporin-2 expression in the hypertonic environment. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 296; C641-653.
- He L & Hannon GJ, 2004, MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*, 5; 522–531.
- He F, Peng F, Xia X, Zhao C, Luo Q, Guan W, Li Z, Yu X & Huang F, 2014, MiR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1. *Diabetologia*, 57; 1726–1736.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S & Parker MG, 1997, A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387; 733–736.

- Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A, Wurtz JM, Moras D & Rafestin-Oblin ME, 2000, Crucial role of the H11-H12 loop in stabilizing the active conformation of the human mineralocorticoid receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14; 1210–1221.
- Herman JP, Patel PD, Akil H & Watson SJ, 1989, Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 3; 1886–1894.
- Hinman MN & Lou H, 2008, Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65; 3168–3181.
- Hirasawa G, Sasano H, Suzuki T, Takeyama J, Muramatsu Y, Fukushima K, Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H & Krozowski ZS, 1999, 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84; 1453–1458.
- Hirasawa G, Takeyama J, Sasano H, Fukushima K, Suzuki T, Muramatsu Y, Darnel AD, Kaneko C, Hiwatashi N, Toyota T *et al.*, 2000, 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85; 1306–1309.
- Hirata A, Maeda N, Hiuge A, Hibuse T, Fujita K, Okada T, Kihara S, Funahashi T & Shimomura I, 2009, Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovascular Research*, 84; 164–172.
- Hirschberg D, Jägerbrink T, Samskog J, Gustafsson M, Ståhlberg M, Alvelius G, Husman B, Carlquist M, Jörnvall H & Bergman T, 2004, Detection of phosphorylated peptides in proteomic analyses using microfluidic compact disk technology. *Analytical Chemistry*, 76; 5864–5871.
- Holbrook KA & Odland GF, 1980, Regional development of the human epidermis in the first trimester embryo and the second trimester fetus (ages related to the timing of amniocentesis and fetal biopsy). *The Journal of Investigative Dermatology*, 74; 161–168.
- Holland OB & Carr B, 1993, Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin. *Endocrinology*, 132; 2666–2673.
- Horisberger J-D, 2004, Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 19; 377–387.
- Horisberger JD, Lemas V, Kraehenbühl JP & Rossier BC, 1991, Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annual Review of Physiology*, 53; 565–584.
- Houseley J & Tollervy D, 2009, The many pathways of RNA degradation. *Cell*, 136; 763–776.
- Hu X & Lazar MA, 1999, The CoNRN motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*, 402; 93–96.
- Hu F, Wang M, Xiao T, Yin B, He L, Meng W, Dong M & Liu F, 2015, miR-30 promotes thermogenesis and the development of beige fat by targeting RIP140. *Diabetes*, 64; 2056–2068.
- Huang W, Liu H, Wang T, Zhang T, Kuang J, Luo Y, Chung SSM, Yuan L & Yang JY, 2011, Tonicity-responsive microRNAs contribute to the maximal induction of osmoregulatory transcription factor OREBP in response to high-NaCl hypertonicity. *Nucleic Acids Research*, 39; 475–485.
- Hubert E-L, Teissier R, Fernandes-Rosa FL, Fay M, Rafestin-Oblin M-E, Jeunemaitre X, Metz C, Escoubet B & Zennaro M-C, 2011, Mineralocorticoid receptor mutations and a severe recessive pseudohypoaldosteronism type 1. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 22; 1997–2003.
- Hudson WH, Youn C & Ortlund EA, 2014, Crystal structure of the mineralocorticoid receptor DNA binding domain in complex with DNA. *PLoS One*, 9; e107000.
- Hui J, Stangl K, Lane WS & Bindereif A, 2003, HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nature Structural Biology*, 10; 33–37.
- Hummler E, Barker P, Talbot C, Wang Q, Verdumo C, Grubb B, Gatzky J, Burnier M, Horisberger JD, Beermann F *et al.*, 1997, A mouse model for the renal salt-wasting syndrome

- pseudohypoaldosteronism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94; 11710–11715.
- Hunter RW, Ivy JR & Bailey MA, 2014, Glucocorticoids and renal Na⁺ transport: implications for hypertension and salt sensitivity. *The Journal of Physiology*, 592; 1731–1744.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T & Zamore PD, 2001, A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 293; 834–838.
- Igarashi J, Hashimoto T, Shoji K, Yoneda K, Tsukamoto I, Morieue T, Kubota Y & Kosaka H, 2013, Dexamethasone induces caveolin-1 in vascular endothelial cells: implications for attenuated responses to VEGF. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 304; C790-800.
- Ino T, Yasui H, Hirano M & Kurosawa Y, 1995, Identification of a member of the TIS11 early response gene family at the insertion point of a DNA fragment containing a gene for the T-cell receptor beta chain in an acute T-cell leukemia. *Oncogene*, 11; 2705–2710.
- Izquierdo JM, 2008, Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. *The Journal of Biological Chemistry*, 283; 19077–19084.
- Izquierdo JM, 2010, Cell-specific regulation of Fas exon 6 splicing mediated by Hu antigen R. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402; 324–328.
- Izquierdo JM & Valcárcel J, 2007, Two isoforms of the T-cell intracellular antigen 1 (TIA-1) splicing factor display distinct splicing regulation activities. Control of TIA-1 isoform ratio by TIA-1-related protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 282; 19410–19417.
- Izquierdo JM, Majós N, Bonnal S, Martínez C, Castelo R, Guigó R, Bilbao D & Valcárcel J, 2005, Regulation of Fas Alternative Splicing by Antagonistic Effects of TIA-1 and PTB on Exon Definition. *Molecular Cell*, 19; 475–484.
- Jaisser F & Farman N, 2016, Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 68; 49–75.
- Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB & Gouaux E, 2007, Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, 449; 316–323.
- Jeyaraj SC, Singh M, Ayupova DA, Govindaraju S & Lee BS, 2010, Transcriptional control of human antigen R by bone morphogenetic protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 285; 4432–4440.
- Jiang JQ, Young G, Kobayashi T & Nagahama Y, 1998, Eel (*Anguilla japonica*) testis 11beta-hydroxylase gene is expressed in interrenal tissue and its product lacks aldosterone synthesizing activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 146; 207–211.
- Jimenez-Canino R, Fernandes MX & Alvarez de la Rosa D, 2016, Phosphorylation of Mineralocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Impairs Receptor Activation and Has a Dominant Negative Effect over Non-phosphorylated Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 291; 19068–19078.
- Jørgensen PL, 1986, Structure, function and regulation of Na,K-ATPase in the kidney. *Kidney International*, 29; 10–20.
- Kadmiel M & Cidlowski JA, 2013, Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34; 518–530.
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I & Anderson P, 1999, RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of Cell Biology*, 147; 1431–1442.
- Keene JD, 2007, RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature Reviews. Genetics*, 8; 533–543.
- Kellenberger S & Schild L, 2002, Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiological Reviews*, 82; 735–767.

- Kenealy MR, Flouriot G, Sonntag-Buck V, Dandekar T, Brand H & Gannon F, 2000, The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. *Endocrinology*, 141; 2805–2813.
- Kenouch S, Lombes M, Delahaye F, Eugene E, Bonvalet JP & Farman N, 1994, Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 79; 1334–1341.
- Kerscher O, Felberbaum R & Hochstrasser M, 2006, Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22; 159–180.
- Kiillerich P, Kristiansen K & Madsen SS, 2007, Hormone receptors in gills of smolting Atlantic salmon, *Salmo salar*: expression of growth hormone, prolactin, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *General and Comparative Endocrinology*, 152; 295–303.
- Kiillerich P, Triqueneaux G, Christensen NM, Trayer V, Terrien X, Lombès M & Prunet P, 2015, Interaction between the trout mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in vitro. *Journal of Molecular Endocrinology*, 55; 55–68.
- Kim HS, Kuwano Y, Zhan M, Pullmann R, Mazan-Mamczarz K, Li H, Kedersha N, Anderson P, Wilce MCJ, Gorospe M *et al.*, 2007, Elucidation of a C-rich signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein TIAR. *Molecular and Cellular Biology*, 27; 6806–6817.
- Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL & Gorospe M, 2009, HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & Development*, 23; 1743–1748.
- Kino T, Jaffe H, Amin ND, Chakrabarti M, Zheng Y-L, Chrousos GP & Pant HC, 2010, Cyclin-dependent kinase 5 modulates the transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor and regulates expression of brain-derived neurotrophic factor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24; 941–952.
- Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakon H, Yosef N, Linker RA, Muller DN & Hafler DA, 2013, Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, 496; 518–522.
- Kotelevtsev Y, Brown RW, Fleming S, Kenyon C, Edwards CR, Seckl JR & Mullins JJ, 1999, Hypertension in mice lacking 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *The Journal of Clinical Investigation*, 103; 683–689.
- Kozomara A & Griffiths-Jones S, 2011, miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39; D152-157.
- Krozowski Z & Funder JW, 1981, Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology*, 109; 1811–1813.
- Kuhn E & Lombès M, 2013a, The mineralocorticoid receptor: a new player controlling energy homeostasis. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 15; 59–69.
- Kuhn E & Lombès M, 2013b, The mineralocorticoid receptor: a new player controlling energy homeostasis. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 15; 59–69.
- Kuhn E, Bourgeois C, Keo V, Viengchareun S, Muscat A, Meduri G, Le Menuet D, Fève B & Lombès M, 2014, Paradoxical resistance to high-fat diet-induced obesity and altered macrophage polarization in mineralocorticoid receptor-overexpressing mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 306; E75-90.
- Kuure S, Vuolteenaho R & Vainio S, 2000, Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mechanisms of Development*, 92; 31–45.
- Kwak SP, Patel PD, Thompson RC, Akil H & Watson SJ, 1993, 5'-Heterogeneity of the mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic acid: differential expression and regulation of splice variants within the rat hippocampus. *Endocrinology*, 133; 2344–2350.

- Lam EYM, Funder JW, Nikolic-Paterson DJ, Fuller PJ & Young MJ, 2006, Mineralocorticoid receptor blockade but not steroid withdrawal reverses renal fibrosis in deoxycorticosterone/salt rats. *Endocrinology*, 147; 3623–3629.
- Lang F & Stournaras C, 2013, Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens, Greece)*, 12; 160–171.
- Lang F, Klingel K, Wagner CA, Stegen C, Warntges S, Friedrich B, Lanzendorfer M, Melzig J, Moschen I, Steuer S *et al.*, 2000, Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97; 8157–8162.
- Laroia G & Schneider RJ, 2002, Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms. *Nucleic Acids Research*, 30; 3052–3058.
- Le Billan F, Khan JA, Lamribet K, Viengchareun S, Bouligand J, Fagart J & Lombès M, 2015, Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29; 3977–3989.
- Le Guiner C, Lejeune F, Galiana D, Kister L, Breathnach R, Stévenin J & Del Gatto-Konczak F, 2001, TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, 276; 40638–40646.
- Le Menuet D, Viengchareun S, Penfornis P, Walker F, Zennaro MC & Lombès M, 2000, Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 275; 7878–7886.
- Le Menuet D, Isnard R, Bichara M, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Walker F, Zennaro MC & Lombès M, 2001, Alteration of cardiac and renal functions in transgenic mice overexpressing human mineralocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 276; 38911–38920.
- Le Moëllic C, Ouvrard-Pascaud A, Capurro C, Cluzeaud F, Fay M, Jaisser F, Farman N & Blot-Chaubaud M, 2004, Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC α activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 15; 1145–1160.
- Lebedeva S, Jens M, Theil K, Schwanhäusser B, Selbach M, Landthaler M & Rajewsky N, 2011, Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Molecular Cell*, 43; 340–352.
- Lee RC, Feinbaum RL & Ambros V, 1993, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75; 843–854.
- Lee H, Woodman SE, Engelman JA, Volonté D, Galbiati F, Kaufman HL, Lublin DM & Lisanti MP, 2001, Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *The Journal of Biological Chemistry*, 276; 35150–35158.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH & Kim VN, 2004, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23; 4051–4060.
- Lee Y-K, Choi Y-H, Chua S, Park YJ & Moore DD, 2006, Phosphorylation of the hinge domain of the nuclear hormone receptor LRH-1 stimulates transactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281; 7850–7855.
- Lee H-A, Lee D-Y, Cho H-M, Kim S-Y, Iwasaki Y & Kim IK, 2013, Histone deacetylase inhibition attenuates transcriptional activity of mineralocorticoid receptor through its acetylation and prevents development of hypertension. *Circulation Research*, 112; 1004–1012.
- van Leeuwen F, Gafken PR & Gottschling DE, 2002, Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell*, 109; 745–756.

- Lema I, Viengchareun S, Lamribet K, Keo V, Blanchard A, Cherradi N & Lombès M, 2014, Hypertonicity compromises renal mineralocorticoid receptor signaling through Tis11b-mediated post-transcriptional control. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25; 2213–2221.
- Leroy V, De Seigneux S, Agassiz V, Hasler U, Rafestin-Oblin M-E, Vinciguerra M, Martin P-Y & Féraille E, 2009, Aldosterone activates NF-kappaB in the collecting duct. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20; 131–144.
- Letunic I, Doerks T & Bork P, 2009, SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 37; D229-232.
- Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, Chrousos GP & Klemm DJ, 1997, Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *The Journal of Experimental Medicine*, 186; 1567–1574.
- Li Y, Suino K, Daugherty J & Xu HE, 2005, Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Molecular Cell*, 19; 367–380.
- Liang M, Cai T, Tian J, Qu W & Xie Z-J, 2006, Functional characterization of Src-interacting Na/K-ATPase using RNA interference assay. *The Journal of Biological Chemistry*, 281; 19709–19719.
- Licatalosi DD, Mele A, Fak JJ, Ule J, Kayikci M, Chi SW, Clark TA, Schweitzer AC, Blume JE, Wang X *et al.*, 2008, HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature*, 456; 464–469.
- Lis M, Hamet P, Gutkowska J, Maurice G, Seidah NG, Larivière N, Chrétien M & Genest J, 1981, Effect of N-terminal portion of pro-opiomelanocortin on aldosterone release by human adrenal adenoma in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 52; 1053–1056.
- Liu W, Wang J, Sauter NK & Pearce D, 1995, Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92; 12480–12484.
- Liu J, Hu J & Corey DR, 2012, Expanding the action of duplex RNAs into the nucleus: redirecting alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 40; 1240–1250.
- Loffing J & Schild L, 2005, Functional domains of the epithelial sodium channel. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16; 3175–3181.
- Lombes M, Claire M, Pinto M, Michaud A & Rafestin-Oblin ME, 1984, Aldosterone binding in the human colon carcinoma cell line HT29: correlation with cell differentiation. *Journal of Steroid Biochemistry*, 20; 329–333.
- Lombès M, Farman N, Oblin ME, Baulieu EE, Bonvalet JP, Erlanger BF & Gasc JM, 1990a, Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87; 1086–1088.
- Lombès M, Farman N, Oblin ME, Baulieu EE, Bonvalet JP, Erlanger BF & Gasc JM, 1990b, Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87; 1086–1088.
- Lombès M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N & Bonvalet JP, 1992, Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circulation Research*, 71; 503–510.
- Lombès M, Binart N, Delahaye F, Baulieu EE & Rafestin-Oblin ME, 1994, Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *The Biochemical Journal*, 302 (Pt 1); 191–197.
- Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N & Rafestin-Oblin ME, 1994, The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 135; 834–840.

- López de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X & Gorospe M, 2004, Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101; 2987–2992.
- Lorenzen JM, Haller H & Thum T, 2011, MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nature Reviews. Nephrology*, 7; 286–294.
- Lösel R & Wehling M, 2003, Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4; 46–56.
- Lothar A & Hein L, 2016, Vascular Mineralocorticoid Receptors: Linking Risk Factors, Hypertension, and Heart Disease. *Hypertension*, 68; 6–10.
- Lotshaw DP, 2001, Role of membrane depolarization and T-type Ca²⁺ channels in angiotensin II and K⁺ stimulated aldosterone secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 175; 157–171.
- Lu L, Zheng L, Si Y, Luo W, Dujardin G, Kwan T, Potochick NR, Thompson SR, Schneider DA & King PH, 2014, Hu antigen R (HuR) is a positive regulator of the RNA-binding proteins TDP-43 and FUS/TLS: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 289; 31792–31804.
- Lui P-Y, Jin D-Y & Stevenson NJ, 2015, MicroRNA: master controllers of intracellular signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72; 3531–3542.
- Lumbers ER, 1999, Angiotensin and aldosterone. *Regulatory Peptides*, 80; 91–100.
- Luo Y, Liu Y, Liu M, Wei J, Zhang Y, Hou J, Huang W, Wang T, Li X, He Y *et al.*, 2014, Sfmbt2 10th intron-hosted miR-466(a/e)-3p are important epigenetic regulators of Nfat5 signaling, osmoregulation and urine concentration in mice. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1839; 97–106.
- Lykke-Andersen S & Jensen TH, 2015, Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16; 665–677.
- Lykke-Andersen J & Wagner E, 2005, Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes & Development*, 19; 351–361.
- Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A & Furneaux H, 1996, Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271; 8144–8151.
- Macconi D, Tomasoni S, Romagnani P, Trionfini P, Sangalli F, Mazzinghi B, Rizzo P, Lazzeri E, Abbate M, Remuzzi G *et al.*, 2012, MicroRNA-324-3p promotes renal fibrosis and is a target of ACE inhibition. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 23; 1496–1505.
- MacKenzie SM, Clark CJ, Ingram MC, Lai M, Seckl J, Gomez-Sanchez CE, Fraser R, Connell JM & Davies E, 2000a, Corticosteroid production by fetal rat hippocampal neurons. *Endocrine Research*, 26; 531–535.
- MacKenzie SM, Clark CJ, Fraser R, Gómez-Sánchez CE, Connell JM & Davies E, 2000b, Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *Journal of Molecular Endocrinology*, 24; 321–328.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P *et al.*, 1995, The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83; 835–839.
- Mao XP, Zhang LS, Huang B, Zhou SY, Liao J, Chen LW, Qiu SP & Chen JX, 2015, Mir-135a enhances cellular proliferation through post-transcriptionally regulating PHLPP2 and FOXO1 in human bladder cancer. *Journal of Translational Medicine*, 13; 86.
- Marino M, Ascenzi P & Acconcia F, 2006, S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids*, 71; 298–303.
- Maris C, Dominguez C & Allain FH-T, 2005, The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *The FEBS Journal*, 272; 2118–2131.

- Marissal-Arvy N, Lombès M, Petterson J, Moisan M-P & Mormède P, 2004, Gain of function mutation in the mineralocorticoid receptor of the Brown Norway rat. *The Journal of Biological Chemistry*, 279; 39232–39239.
- Marrone AK, Stolz DB, Bastacky SI, Kostka D, Bodnar AJ & Ho J, 2014, MicroRNA-17~92 is required for nephrogenesis and renal function. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25; 1440–1452.
- Martinerie L, Pussard E, Foix-L'Hélias L, Petit F, Cosson C, Boileau P & Lombès M, 2009a, Physiological partial aldosterone resistance in human newborns. *Pediatric Research*, 66; 323–328.
- Martinerie L, Viengchareun S, Delezoide A-L, Jaubert F, Sinico M, Prevot S, Boileau P, Meduri G & Lombès M, 2009b, Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology*, 150; 4414–4424.
- Martinerie L, Viengchareun S, Meduri G, Kim H-S, Luther JM & Lombès M, 2011, Aldosterone postnatally, but not at birth, is required for optimal induction of renal mineralocorticoid receptor expression and sodium reabsorption. *Endocrinology*, 152; 2483–2491.
- Martinerie L, Munier M, Le Menuet D, Meduri G, Viengchareun S & Lombès M, 2013, The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie*, 95; 148–157.
- Marver D, Stewart J, Funder JW, Feldman D & Edelman IS, 1974, Renal aldosterone receptors: studies with (3H)aldosterone and the anti-mineralocorticoid (3H)spiro lactone (SC-26304). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71; 1431–1435.
- Mazan-Mamczarz K, Kuwano Y, Zhan M, White EJ, Martindale JL, Lal A & Gorospe M, 2009, Identification of a signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein AUF1. *Nucleic Acids Research*, 37; 204–214.
- McDonald FJ, Yang B, Hrstka RF, Drummond HA, Tarr DE, McCray PB, Stokes JB, Welsh MJ & Williamson RA, 1999, Disruption of the beta subunit of the epithelial Na⁺ channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96; 1727–1731.
- McInerney EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Kronen A, Inostroza J, Torchia J, Nolte RT, Assa-Munt N *et al.*, 1998, Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes & Development*, 12; 3357–3368.
- McManus CJ & Graveley BR, 2011, RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21; 373–379.
- Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE & MacGregor GA, 2005, Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiological Reviews*, 85; 679–715.
- Merrell KW, Crofts JD, Smith RL, Sin JH, Kmetzsch KE, Merrell A, Miguel RO, Candelaria NR & Lin C-Y, 2011, Differential recruitment of nuclear receptor coregulators in ligand-dependent transcriptional repression by estrogen receptor- α . *Oncogene*, 30; 1608–1614.
- Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M & Gannon F, 2003, Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, 115; 751–763.
- Mirshahi M, Mirshahi A, Sedighian R, Hecquet C, Faure JP & Agarwal MK, 1997, Immunochemical demonstration of the mineralocorticoid receptor in ocular tissues. *Neuroendocrinology*, 65; 70–78.
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-Verber P, Sar S, Dessen P & Milgrom E, 1993, Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1216; 289–292.

- Mittal N, Scherrer T, Gerber AP & Janga SC, 2011, Interplay between posttranscriptional and posttranslational interactions of RNA-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 409; 466–479.
- Miyata K, Rahman M, Shokoji T, Nagai Y, Zhang G-X, Sun G-P, Kimura S, Yukimura T, Kiyomoto H, Kohno M *et al.*, 2005, Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16; 2906–2912.
- Mladinov D, Liu Y, Mattson DL & Liang M, 2013, MicroRNAs contribute to the maintenance of cell-type-specific physiological characteristics: miR-192 targets Na⁺/K⁺-ATPase β 1. *Nucleic Acids Research*, 41; 1273–1283.
- Montalescot G, Pitt B, Lopez de Sa E, Hamm CW, Flather M, Verheugt F, Shi H, Turgonyi E, Orri M, Vincent J *et al.*, 2014, Early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure: the Randomized Double-Blind Reminder Study. *European Heart Journal*, 35; 2295–2302.
- Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K & Shibuya H, 2005, WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *The Journal of Biological Chemistry*, 280; 42685–42693.
- Morrison N, Harrap SB, Arriza JL, Boyd E & Connor JM, 1990, Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Human Genetics*, 85; 130–132.
- Mortensen RD, Serra M, Steitz JA & Vasudevan S, 2011, Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108; 8281–8286.
- Mottis A, Mouchiroud L & Auwerx J, 2013, Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes & Development*, 27; 819–835.
- Mount DB, 2014, Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 9; 1974–1986.
- Mukherjee N, Corcoran DL, Nusbaum JD, Reid DW, Georgiev S, Hafner M, Ascano M, Tuschl T, Ohler U & Keene JD, 2011, Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Molecular Cell*, 43; 327–339.
- Mukherjee N, Jacobs NC, Hafner M, Kennington EA, Nusbaum JD, Tuschl T, Blackshear PJ & Ohler U, 2014, Global target mRNA specification and regulation by the RNA-binding protein ZFP36. *Genome Biology*, 15; R12.
- Munier M, Meduri G, Viengchareun S, Leclerc P, Le Menuet D & Lombès M, 2010, Regulation of mineralocorticoid receptor expression during neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Endocrinology*, 151; 2244–2254.
- Murai-Takeda A, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Suda N, Mitsuishi Y, Jo R, Kitagawa H, Kato S *et al.*, 2010, NF-YC functions as a corepressor of agonist-bound mineralocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 285; 8084–8093.
- Muro AF, Caputi M, Pariyarath R, Pagani F, Buratti E & Baralle FE, 1999, Regulation of fibronectin EDA exon alternative splicing: possible role of RNA secondary structure for enhancer display. *Molecular and Cellular Biology*, 19; 2657–2671.
- Naccache A, Louiset E, Duparc C, Laquerrière A, Patrier S, Renouf S, Gomez-Sanchez CE, Mukai K, Lefebvre H & Castanet M, 2016, Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 434; 69–80.
- Nagalakshmi VK, Ren Q, Pugh MM, Valerius MT, McMahon AP & Yu J, 2011, Dicer regulates the development of nephrogenic and ureteric compartments in the mammalian kidney. *Kidney International*, 79; 317–330.

- Náray-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G & Fejes-Tóth G, 1999, SGK is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 274; 16973–16978.
- Náray-Fejes-Tóth A, Snyder PM & Fejes-Tóth G, 2004, The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101; 17434–17439.
- Náray-Fejes-Tóth A, Boyd C & Fejes-Tóth G, 2008, Regulation of epithelial sodium transport by promyelocytic leukemia zinc finger protein. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 295; F18–26.
- Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Chen L-M, Chai KX, Chao J *et al.*, 2002, Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney. *The Journal of Clinical Investigation*, 109; 401–408.
- Neelamraju Y, Hashemikhabir S & Janga SC, 2015, The human RBPome: from genes and proteins to human disease. *Journal of Proteomics*, 127; 61–70.
- Nguyen Dinh Cat A, Ouvrard-Pascaud A, Tronche F, Clemessy M, Gonzalez-Nunez D, Farman N & Jaisser F, 2009, Conditional transgenic mice for studying the role of the glucocorticoid receptor in the renal collecting duct. *Endocrinology*, 150; 2202–2210.
- Nilsen TW & Graveley BR, 2010, Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463; 457–463.
- Nishi M & Kawata M, 2007, Dynamics of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor: implications from live cell imaging studies. *Neuroendocrinology*, 85; 186–192.
- Nishiyama A, Yao L, Fan Y, Kyaw M, Kataoka N, Hashimoto K, Nagai Y, Nakamura E, Yoshizumi M, Shokoji T *et al.*, 2005, Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 45; 710–716.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999, A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97; 161–163.
- Obradović D, Tirard M, Némethy Z, Hirsch O, Gronemeyer H & Almeida OFX, 2004, DAXX, FLASH, and FAF-1 modulate mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated transcription in hippocampal cells—toward a basis for the opposite actions elicited by two nuclear receptors? *Molecular Pharmacology*, 65; 761–769.
- Oltean S & Bates DO, 2014, Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene*, 33; 5311–5318.
- O'Malley BW, 2007, Coregulators: from whence came these 'master genes'. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21; 1009–1013.
- Ono K, Kuwabara Y & Han J, 2011, MicroRNAs and cardiovascular diseases. *The FEBS Journal*, 278; 1619–1633.
- Ordentlich P, Downes M, Xie W, Genin A, Spinner NB & Evans RM, 1999, Unique forms of human and mouse nuclear receptor corepressor SMRT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96; 2639–2644.
- Ørom UA, Nielsen FC & Lund AH, 2008, MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell*, 30; 460–471.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ & Blencowe BJ, 2008, Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*, 40; 1413–1415.
- Papasaikas P & Valcárcel J, 2016, The Spliceosome: The Ultimate RNA Chaperone and Sculptor. *Trends in Biochemical Sciences*, 41; 33–45.
- Park E-J & Kwon T-H, 2015, A Minireview on Vasopressin-regulated Aquaporin-2 in Kidney Collecting Duct Cells. *Electrolyte & Blood Pressure: E & BP*, 13; 1–6.

- Park EJ, Schroen DJ, Yang M, Li H, Li L & Chen JD, 1999, SMRTe, a silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors-extended isoform that is more related to the nuclear receptor corepressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96; 3519–3524.
- Pascale A & Govoni S, 2012, The complex world of post-transcriptional mechanisms: is their deregulation a common link for diseases? Focus on ELAV-like RNA-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 69; 501–517.
- Pascual-Le Tallec L & Lombès M, 2005, The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19; 2211–2221.
- Pascual-Le Tallec L, Demange C & Lombès M, 2004, Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 150; 585–590.
- Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman MJ & Lombès M, 2005, The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19; 1158–1169.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P *et al.*, 2000, Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408; 86–89.
- Paukku K, Backlund M, De Boer RA, Kalkkinen N, Kontula KK & Lehtonen JYA, 2012, Regulation of AT1R expression through HuR by insulin. *Nucleic Acids Research*, 40; 5250–5261.
- Payne AH & Hales DB, 2004, Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25; 947–970.
- Pearce P & Funder JW, 1987, High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 14; 859–866.
- Petrovich E, Asher C & Garty H, 2014, Induction of FKBP51 by aldosterone in intestinal epithelium. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139; 78–87.
- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M *et al.*, 2005, Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature Methods*, 2; 269–276.
- Pfeffer MA, Claggett B, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I *et al.*, 2015, Regional variation in patients and outcomes in the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) trial. *Circulation*, 131; 34–42.
- Phillips RS, Ramos SBV & Blackshear PJ, 2002, Members of the tristetraprolin family of tandem CCCH zinc finger proteins exhibit CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling. *The Journal of Biological Chemistry*, 277; 11606–11613.
- Pieczyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Krays V, Streuli M *et al.*, 2000, TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *The EMBO Journal*, 19; 4154–4163.
- Pinon GM, Fagart J, Souque A, Auzou G, Vandewalle A & Rafestin-Oblin M-E, 2004, Identification of steroid ligands able to inactivate the mineralocorticoid receptor harboring the S810L mutation responsible for a severe form of hypertension. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217; 181–188.
- Pippal JB & Fuller PJ, 2008, Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, 41; 405–413.
- Pitovski DZ, Drescher MJ & Drescher DG, 1993, High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in the mammalian inner ear. *Hearing Research*, 69; 10–14.

- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J & Wittes J, 1999, The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *The New England Journal of Medicine*, 341; 709–717.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M *et al.*, 2003, Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 348; 1309–1321.
- Piwien-Pilipuk G & Galigniana MD, 1998, Tautomycin inhibits phosphatase-dependent transformation of the rat kidney mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 144; 119–130.
- Pratt WB & Toft DO, 1997, Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews*, 18; 306–360.
- Pressley L & Funder JW, 1975, Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in gut mucosa. *Endocrinology*, 97; 588–596.
- Pujo L, Fagart J, Gary F, Papadimitriou DT, Claës A, Jeunemaître X & Zennaro M-C, 2007, Mineralocorticoid receptor mutations are the principal cause of renal type 1 pseudohypoaldosteronism. *Human Mutation*, 28; 33–40.
- Pullmann R & Rabb H, 2014, HuR and other turnover- and translation-regulatory RNA-binding proteins: implications for the kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 306; F569-576.
- Pullmann R, Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Yang X & Gorospe M, 2007, Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 27; 6265–6278.
- Quinkler M, Zehnder D, Eardley KS, Lепенies J, Howie AJ, Hughes SV, Cockwell P, Hewison M & Stewart PM, 2005, Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria. *Circulation*, 112; 1435–1443.
- Rafestin-Oblin ME, Lombes M, Michiel JB, Michaud A & Claire M, 1984, Mineralocorticoid receptors in the epithelial cells of human colon and ileum. *Journal of Steroid Biochemistry*, 20; 311–315.
- Rafestin-Oblin M-E, Souque A, Bocchi B, Pinon G, Fagart J & Vandewalle A, 2003, The severe form of hypertension caused by the activating S810L mutation in the mineralocorticoid receptor is cortisone related. *Endocrinology*, 144; 528–533.
- Rakova N, Jüttner K, Dahlmann A, Schröder A, Linz P, Kopp C, Rauh M, Goller U, Beck L, Agureev A *et al.*, 2013, Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human Na(+) balance. *Cell Metabolism*, 17; 125–131.
- Ramani AK, Calarco JA, Pan Q, Mavandadi S, Wang Y, Nelson AC, Lee LJ, Morris Q, Blencowe BJ, Zhen M *et al.*, 2011, Genome-wide analysis of alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research*, 21; 342–348.
- Ramírez-Salazar M, Romero-Gutiérrez G, Zaina S, Malacara JM, Kornhauser C & Pérez-Luque E, 2011, Relationship of aldosterone synthase gene (C-344T) and mineralocorticoid receptor (S810L) polymorphisms with gestational hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 25; 320–326.
- Ramos SBV, 2012, Characterization of DeltaN-Zfp36l2 mutant associated with arrest of early embryonic development and female infertility. *The Journal of Biological Chemistry*, 287; 13116–13127.
- Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P & Levin ER, 2003, Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 23; 1633–1646.
- Reilly RF & Ellison DH, 2000, Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiological Reviews*, 80; 277–313.

- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR & Ruvkun G, 2000, The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403; 901–906.
- Rezaei M, Andrieu T, Neuenschwander S, Bruggmann R, Mordasini D, Frey FJ, Vogt B & Frey BM, 2014, Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by microRNA. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 64; 860–866.
- Richards J, Cheng K-Y, All S, Skopis G, Jeffers L, Lynch IJ, Wingo CS & Gumz ML, 2013a, A role for the circadian clock protein Per1 in the regulation of aldosterone levels and renal Na⁺ retention. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 305; F1697-1704.
- Richards J, Jeffers LA, All SC, Cheng K-Y & Gumz ML, 2013b, Role of Per1 and the mineralocorticoid receptor in the coordinate regulation of α ENaC in renal cortical collecting duct cells. *Frontiers in Physiology*, 4; 253.
- Robertson S, MacKenzie SM, Alvarez-Madrazo S, Diver LA, Lin J, Stewart PM, Fraser R, Connell JM & Davies E, 2013, MicroRNA-24 is a novel regulator of aldosterone and cortisol production in the human adrenal cortex. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 62; 572–578.
- Rogerson FM & Fuller PJ, 2003, Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 200; 45–55.
- Rogerson FM, Dimopoulos N, Sluka P, Chu S, Curtis AJ & Fuller PJ, 1999, Structural determinants of aldosterone binding selectivity in the mineralocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 274; 36305–36311.
- Rogerson FM, Yao Y-Z, Elsass RE, Dimopoulos N, Smith BJ & Fuller PJ, 2007, A critical region in the mineralocorticoid receptor for aldosterone binding and activation by cortisol: evidence for a common mechanism governing ligand binding specificity in steroid hormone receptors. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21; 817–828.
- Ron D & Walter P, 2007, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8; 519–529.
- Rondinone CM, Rodbard D & Baker ME, 1993, Aldosterone stimulated differentiation of mouse 3T3-L1 cells into adipocytes. *Endocrinology*, 132; 2421–2426.
- Rossier BC, 2014, Epithelial sodium channel (ENaC) and the control of blood pressure. *Current Opinion in Pharmacology*, 15; 33–46.
- Rossier BC, Staub O & Hummler E, 2013, Genetic dissection of sodium and potassium transport along the aldosterone-sensitive distal nephron: importance in the control of blood pressure and hypertension. *FEBS Letters*, 587; 1929–1941.
- Rossier BC, Baker ME & Studer RA, 2015, Epithelial sodium transport and its control by aldosterone: the story of our internal environment revisited. *Physiological Reviews*, 95; 297–340.
- Rothrock CR, House AE & Lynch KW, 2005, HnRNP L represses exon splicing via a regulated exonic splicing silencer. *The EMBO Journal*, 24; 2792–2802.
- Roy A, Al-Qusairi L, Donnelly BF, Ronzaud C, Marciszyn AL, Gong F, Chang YPC, Butterworth MB, Pastor-Soler NM, Hallows KR *et al.*, 2015, Alternatively spliced proline-rich cassettes link WNK1 to aldosterone action. *The Journal of Clinical Investigation*, 125; 3433–3448.
- Rutkowski DT & Kaufman RJ, 2004, A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology*, 14; 20–28.
- Sands JM & Layton HE, 2014, Advances in understanding the urine-concentrating mechanism. *Annual Review of Physiology*, 76; 387–409.
- Sarkar B, Lu J-Y & Schneider RJ, 2003, Nuclear import and export functions in the different isoforms of the AUF1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein family. *The Journal of Biological Chemistry*, 278; 20700–20707.

- Sartorato P, Khaldi Y, Lapeyraque A-L, Armanini D, Kuhnle U, Salomon R, Caprio M, Viengchareun S, Lombès M & Zennaro M-C, 2004, Inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in Type I pseudohypoaldosteronism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217; 119–125.
- Satoh N, Nakamura M, Suzuki M, Suzuki A, Seki G & Horita S, 2015, Roles of Akt and SGK1 in the Regulation of Renal Tubular Transport. *BioMed Research International*, 2015; 971697.
- Schaaf MJM & Cidlowski JA, 2002, AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids*, 67; 627–636.
- Schwartz B & Wysocki A, 1997, Mineralocorticoid receptors in the rabbit iris-ciliary body. *Ophthalmic Research*, 29; 42–47.
- Sequeira-Lopez MLS, Weatherford ET, Borges GR, Monteagudo MC, Pentz ES, Harfe BD, Carretero O, Sigmund CD & Gomez RA, 2010, The microRNA-processing enzyme dicer maintains juxtaglomerular cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21; 460–467.
- Shi S, Yu L, Chiu C, Sun Y, Chen J, Khitrov G, Merckenschlager M, Holzman LB, Zhang W, Mundel P *et al.*, 2008, Podocyte-selective deletion of dicer induces proteinuria and glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 19; 2159–2169.
- Shibata S, Rinehart J, Zhang J, Moeckel G, Castañeda-Bueno M, Stiegler AL, Boggon TJ, Gamba G & Lifton RP, 2013, Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell Metabolism*, 18; 660–671.
- Shimada H, Ichikawa H, Nakamura S, Katsu R, Iwasa M, Kitabayashi I & Ohki M, 2000, Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF. *Blood*, 96; 655–663.
- Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Schindler O & Reichstein T, 1954, [Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid]. *Experientia*, 10; 132–133.
- Singh M, Martinez AR, Govindaraju S & Lee BS, 2013, HuR inhibits apoptosis by amplifying Akt signaling through a positive feedback loop. *Journal of Cellular Physiology*, 228; 182–189.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR & 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. *Molecular Cell*, 5; 659–669.
- Smoak K & Cidlowski JA, 2006, Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 26; 9126–9135.
- Söber S, Laan M & Annilo T, 2010, MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391; 727–732.
- Srikantan S & Gorospe M, 2012, HuR function in disease. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17; 189–205.
- Srikantan S, Tominaga K & Gorospe M, 2012, Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Current Protein & Peptide Science*, 13; 372–379.
- Stevens M & Oltean S, 2016, Alternative Splicing in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*.
- Stocco DM, 2001, StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology*, 63; 193–213.
- Stoecklin G, Tenenbaum SA, Mayo T, Chittur SV, George AD, Baroni TE, Blackshear PJ & Anderson P, 2008, Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *The Journal of Biological Chemistry*, 283; 11689–11699.

- Stolte EH, de Mazon AF, Leon-Koosterziel KM, Jesiak M, Bury NR, Sturm A, Savelkoul HFJ, van Kemenade BMLV & Flik G, 2008, Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. *The Journal of Endocrinology*, 198; 403–417.
- Stroynowska-Czerwinska A, Fiszer A & Krzyzosiak WJ, 2014, The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71; 2253–2270.
- Stumpo DJ, Byrd NA, Phillips RS, Ghosh S, Maronpot RR, Castranio T, Meyers EN, Mishina Y & Blackshear PJ, 2004, Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of *Zfp36L1*, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Molecular and Cellular Biology*, 24; 6445–6455.
- Stumpo DJ, Broxmeyer HE, Ward T, Cooper S, Hangoc G, Chung YJ, Shelley WC, Richfield EK, Ray MK, Yoder MC *et al.*, 2009, Targeted disruption of *Zfp36L2*, encoding a CCCH tandem zinc finger RNA-binding protein, results in defective hematopoiesis. *Blood*, 114; 2401–2410.
- Sturm A, Bury N, Dengreville L, Fagart J, Flouriot G, Rafestin-Oblin ME & Prunet P, 2005, 11-deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor. *Endocrinology*, 146; 47–55.
- Tait SAS, Tait JF & Coghlan JP, 2004, The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217; 1–21.
- Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY & Takeda R, 1994, Synthesis of corticosterone in the vascular wall. *Endocrinology*, 135; 2283–2286.
- Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY & Takeda R, 1995, Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 25; 170–173.
- Taliec LP-L, Kirsh O, Lecomte M-C, Viengchareun S, Zennaro M-C, Dejean A & Lombès M, 2003, Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17; 2529–2542.
- Tang Y, Liu D, Zhang L, Ingvarsson S & Chen H, 2011, Quantitative analysis of miRNA expression in seven human foetal and adult organs. *PLoS One*, 6; e28730.
- Taylor GA, Carballo E, Lee DM, Lai WS, Thompson MJ, Patel DD, Schenkman DI, Gilkeson GS, Broxmeyer HE, Haynes BF *et al.*, 1996, A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity*, 4; 445–454.
- Teixeira M, Viengchareun S, Butlen D, Ferreira C, Cluzeaud F, Blot-Chabaud M, Lombès M & Ferrary E, 2006, Functional Isk/KvLQT1 potassium channel in a new corticosteroid-sensitive cell line derived from the inner ear. *The Journal of Biological Chemistry*, 281; 10496–10507.
- Thomas GD, 2011, Neural control of the circulation. *Advances in Physiology Education*, 35; 28–32.
- Thomas MP & Lieberman J, 2013, Live or let die: posttranscriptional gene regulation in cell stress and cell death. *Immunological Reviews*, 253; 237–252.
- Tilley WD, Marcelli M, Wilson JD & McPhaul MJ, 1989, Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86; 327–331.
- Tirard M, Almeida OFX, Hutzler P, Melchior F & Michaelidis TM, 2007, Sumoylation and proteasomal activity determine the transactivation properties of the mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 268; 20–29.
- Toubal A, Treuter E, Clément K & Venticlef N, 2013, Genomic and epigenomic regulation of adipose tissue inflammation in obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 24; 625–634.

- Trapp T, Rupprecht R, Castrén M, Reul JM & Holsboer F, 1994, Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron*, 13; 1457–1462.
- Uchida D, Omotehara F, Nakashiro K, Tateishi Y, Hino S, Begum N-M, Fujimori T & Kawamata H, 2003, Posttranscriptional regulation of TSC-22 (TGF-beta-stimulated clone-22) gene by TGF-beta 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305; 846–854.
- Underwood MA, Gilbert WM & Sherman MP, 2005, Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 25; 341–348.
- Urbanet R, Nguyen Dinh Cat A, Feraco A, Venticlef N, El Mogrhabi S, Sierra-Ramos C, Alvarez de la Rosa D, Adler GK, Quilliot D, Rossignol P *et al.*, 2015, Adipocyte Mineralocorticoid Receptor Activation Leads to Metabolic Syndrome and Induction of Prostaglandin D2 Synthase. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 66; 149–157.
- van der Vaart M & Schaaf MJM, 2009, Naturally occurring C-terminal splice variants of nuclear receptors. *Nuclear Receptor Signaling*, 7; e007.
- Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD & Rossier BC, 1997, An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature*, 389; 607–610.
- Vallon V, Wyatt AW, Klingel K, Huang DY, Hussain A, Berchtold S, Friedrich B, Grahmmer F, Belaiba RS, Görlach A *et al.*, 2006, SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 84; 396–404.
- Valverde R, Edwards L & Regan L, 2008, Structure and function of KH domains. *The FEBS Journal*, 275; 2712–2726.
- Van Eekelen JA, Jiang W, De Kloet ER & Bohn MC, 1988, Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 21; 88–94.
- Vasudevan S, Tong Y & Steitz JA, 2007, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y.)*, 318; 1931–1934.
- Verrey F, 1999, Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *The American Journal of Physiology*, 277; F319–327.
- Viengchareun S, Penfornis P, Zennaro MC & Lombès M, 2001, Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors inhibit UCP expression and function in brown adipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280; E640–649.
- Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L & Lombès M, 2007, The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nuclear Receptor Signaling*, 5; e012.
- Viengchareun S, Kamenicky P, Teixeira M, Butlen D, Meduri G, Blanchard-Gutton N, Kurschat C, Lanel A, Martinerie L, Sztal-Mazer S *et al.*, 2009, Osmotic stress regulates mineralocorticoid receptor expression in a novel aldosterone-sensitive cortical collecting duct cell line. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23; 1948–1962.
- Vitari AC, Deak M, Morrice NA & Alessi DR, 2005, The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *The Biochemical Journal*, 391; 17–24.
- Wahl MC, Will CL & Lührmann R, 2009, The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136; 701–718.
- Waldegger S, Klingel K, Barth P, Sauter M, Rfer ML, Kandolf R & Lang F, 1999, h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology*, 116; 1081–1088.
- Walther RF, Atlas E, Carrigan A, Rouleau Y, Edgcombe A, Visentin L, Lamprecht C, Addicks GC, Haché RJG & Lefebvre YA, 2005, A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization

- signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 280; 17549–17561.
- Wang T & Giebisch G, 1996, Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *The American Journal of Physiology*, 271; F143-149.
- Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, Firestone GL & Pearce D, 2001, SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 280; F303-313.
- Wang X, Skelley L, Cade R & Sun Z, 2006, AAV delivery of mineralocorticoid receptor shRNA prevents progression of cold-induced hypertension and attenuates renal damage. *Gene Therapy*, 13; 1097–1103.
- Wang J, Zhang J, Li K, Zhao W & Cui Q, 2012, SpliceDisease database: linking RNA splicing and disease. *Nucleic Acids Research*, 40; D1055-1059.
- Wang Y-B, Leroy V, Maunsbach AB, Doucet A, Hasler U, Dizin E, Hernandez T, de Seigneux S, Martin P-Y & Féraille E, 2014, Sodium transport is modulated by p38 kinase-dependent cross-talk between ENaC and Na,K-ATPase in collecting duct principal cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25; 250–259.
- Weber KT, Sun Y, Wodi LA, Munir A, Jahangir E, Ahokas RA, Gerling IC, Postlethwaite AE & Warrington KJ, 2003, Toward a broader understanding of aldosterone in congestive heart failure. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS*, 4; 155–163.
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC & Firestone GL, 1993, Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Molecular and Cellular Biology*, 13; 2031–2040.
- Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C & Christ M, 1994, Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204; 475–481.
- Weissman AM, Shabek N & Ciechanover A, 2011, The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12; 605–620.
- Wetzel RK & Sweadner KJ, 2001, Immunocytochemical localization of Na-K-ATPase alpha- and gamma-subunits in rat kidney. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 281; F531-545.
- Whaley-Connell A, Johnson MS & Sowers JR, 2010, Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 52; 401–409.
- Wickert L, Selbig J, Watzka M, Stoffel-Wagner B, Schramm J, Bidlingmaier F & Ludwig M, 2000, Differential mRNA expression of the two mineralocorticoid receptor splice variants within the human brain: structure analysis of their different DNA binding domains. *Journal of Neuroendocrinology*, 12; 867–873.
- 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; 855–862.
- Wilson GM, Sun Y, Lu H & Brewer G, 1999, Assembly of AUF1 oligomers on U-rich RNA targets by sequential dimer association. *The Journal of Biological Chemistry*, 274; 33374–33381.
- Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM *et al.*, 2001a, Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science (New York, N.Y.)*, 293; 1107–1112.
- Wilson GM, Sutphen K, Moutafis M, Sinha S & Brewer G, 2001b, Structural remodeling of an A + U-rich RNA element by cation or AUF1 binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 276; 38400–38409.

- Wu L & Belasco JG, 2008, Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, 29; 1–7.
- Wu J, Zheng C, Fan Y, Zeng C, Chen Z, Qin W, Zhang C, Zhang W, Wang X, Zhu X *et al.*, 2014, Downregulation of microRNA-30 facilitates podocyte injury and is prevented by glucocorticoids. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25; 92–104.
- Wulff P, Vallon V, Huang DY, Völkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlünz M, Klingel K, Loffing J *et al.*, 2002, Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *The Journal of Clinical Investigation*, 110; 1263–1268.
- Xiao L & Wang J-Y, 2014, RNA-binding proteins and microRNAs in gastrointestinal epithelial homeostasis and diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 19; 46–53.
- Xu B, Stippec S, Chu P-Y, Lazrak A, Li X-J, Lee B-H, English JM, Ortega B, Huang C-L & Cobb MH, 2005a, WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102; 10315–10320.
- Xu B-E, Stippec S, Lazrak A, Huang C-L & Cobb MH, 2005b, WNK1 activates SGK1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and non-catalytic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 280; 34218–34223.
- Yan B, Zhao L-H, Guo J-T & Zhao J-L, 2012a, miR-429 regulation of osmotic stress transcription factor 1 (OSTF1) in tilapia during osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426; 294–298.
- Yan B, Guo J-T, Zhao L-H & Zhao J-L, 2012b, MiR-30c: a novel regulator of salt tolerance in tilapia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425; 315–320.
- Yang J & Fuller PJ, 2012, Interactions of the mineralocorticoid receptor--within and without. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350; 196–205.
- Yang J & Young MJ, 2009, The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *Journal of Molecular Endocrinology*, 43; 53–64.
- Yang X, Wang X, Nie F, Liu T, Yu X, Wang H, Li Q, Peng R, Mao Z, Zhou Q *et al.*, 2015, miR-135 family members mediate podocyte injury through the activation of Wnt/ β -catenin signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 36; 669–677.
- Yokota K, Shibata H, Kobayashi S, Suda N, Murai A, Kurihara I, Saito I & Saruta T, 2004, Proteasome-mediated mineralocorticoid receptor degradation attenuates transcriptional response to aldosterone. *Endocrine Research*, 30; 611–616.
- Yokota K, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Suda N, Murai-Takeda A, Saito I, Kitagawa H, Kato S, Saruta T *et al.*, 2007, Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *The Journal of Biological Chemistry*, 282; 1998–2010.
- Yoshida A, Nishikawa T, Tamura Y & Yoshida S, 1991, ACTH-induced inhibition of the action of angiotensin II in bovine zona glomerulosa cells. A modulatory effect of cyclic AMP on the angiotensin II receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 266; 4288–4294.
- Zannad F, McMurray JJV, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B & EMPHASIS-HF Study Group, 2011, Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *The New England Journal of Medicine*, 364; 11–21.
- Zennaro MC, Keightley MC, Kotelevtsev Y, Conway GS, Soubrier F & Fuller PJ, 1995, Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 270; 21016–21020.
- Zennaro MC, Le Menuet D & Lombès M, 1996, Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 10; 1549–1560.

- Zennaro MC, Farman N, Bonvalet JP & Lombès M, 1997, Tissue-specific expression of alpha and beta messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal and pathological states. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82; 1345–1352.
- Zennaro MC, Le Menuet D, Viengchareun S, Walker F, Ricquier D & Lombès M, 1998, Hibernoma development in transgenic mice identifies brown adipose tissue as a novel target of aldosterone action. *The Journal of Clinical Investigation*, 101; 1254–1260.
- Zennaro MC, Souque A, Viengchareun S, Poisson E & Lombès M, 2001, A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15; 1586–1598.
- Zennaro M-C, Hubert E-L & Fernandes-Rosa FL, 2012, Aldosterone resistance: structural and functional considerations and new perspectives. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350; 206–215.
- Zhang W, Wagner BJ, Ehrenman K, Schaefer AW, DeMaria CT, Crater D, DeHaven K, Long L & Brewer G, 1993, Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Molecular and Cellular Biology*, 13; 7652–7665.
- Zhang T, Delestienne N, Huez G, Kruys V & Gueydan C, 2005, Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins. *Journal of Cell Science*, 118; 5453–5463.
- Zhang W, Xia X, Jalal DI, Kuncewicz T, Xu W, Lesage GD & Kone BC, 2006, Aldosterone-sensitive repression of ENaC α transcription by a histone H3 lysine-79 methyltransferase. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 290; C936-946.
- Zhang X, Zhou Q, Chen L, Berger S, Wu H, Xiao Z, Pearce D, Zhou X & Zhang W, 2013, Mineralocorticoid receptor antagonizes Dot1a-Af9 complex to increase α ENaC transcription. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 305; F1436-1444.
- Zhao W, Zhao J, Hou M, Wang Y, Zhang Y, Zhao X, Zhang C & Guo D, 2014, HuR and TIA1/TIAL1 are involved in regulation of alternative splicing of SIRT1 pre-mRNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 15; 2946–2958.
- Zhdanova O, Srivastava S, Di L, Li Z, Tchelebi L, Dworkin S, Johnstone DB, Zavadil J, Chong MM, Littman DR *et al.*, 2011, The inducible deletion of Drosha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy. *Kidney International*, 80; 719–730.
- Zhou MY, Gomez-Sanchez CE & Gomez-Sanchez EP, 2000, An alternatively spliced rat mineralocorticoid receptor mRNA causing truncation of the steroid binding domain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 159; 125–131.
- Zhu H, Hasman RA, Barron VA, Luo G & Lou H, 2006, A nuclear function of Hu proteins as neuron-specific alternative RNA processing regulators. *Molecular Biology of the Cell*, 17; 5105–5114.
- Zhu H-J, Wang D-G, Yan J & Xu J, 2015, Up-regulation of microRNA-135a protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by decreasing TXNIP expression in diabetic mice. *American Journal of Translational Research*, 7; 2661–2671.
- Zucconi BE & Wilson GM, 2011, Modulation of neoplastic gene regulatory pathways by the RNA-binding factor AUF1. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 16; 2307–2325.

ANNEXES

Article 3

Glucocorticoids stimulate endolymphatic water reabsorption in inner ear through aquaporin 3 regulation

Jérôme Nevoux, Say Viengchareun, Ingrid Lema, Anne-Lise Lecoq,
Evelyne Ferrary, Marc Lombès

Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. 2015, 467, 1931. 1943.

Glucocorticoids stimulate endolymphatic water reabsorption in inner ear through aquaporin 3 regulation

Jérôme Nevoux · Say Viengchareun · Ingrid Lema · Anne-Lise Lecoq · Evelyne Ferrary · Marc Lombès

Received: 27 June 2014 / Revised: 3 October 2014 / Accepted: 6 October 2014 / Published online: 23 October 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Menière's disease, clinically characterized by fluctuating, recurrent, and invalidating vertigo, hearing loss, and tinnitus, is linked to an increase in endolymph volume, the so-called endolymphatic hydrops. Since dysregulation of water transport could account for the generation of this hydrops, we investigated the role of aquaporin 3 (AQP3) in water transport into endolymph, the K-rich, hyperosmotic fluid that bathes the apical ciliated membrane of sensory cells, and we studied the regulatory effect of dexamethasone upon AQP3 expression and water fluxes. The different AQP subtypes were identified in inner ear by RT-PCR. AQP3 was localized in human utricle and mouse inner ear by immunohistochemistry and confocal microscopy. Unidirectional transepithelial water fluxes were studied by means of $^3\text{H}_2\text{O}$ transport in murine EC5v vestibular

cells cultured on filters, treated or not with dexamethasone (10^{-7} M). The stimulatory effect of dexamethasone upon AQP3 expression was assessed in EC5v cells and in vivo in mice. AQP3 was unambiguously detected in human utricle and was highly expressed in both endolymph secretory structures of the mouse inner ear, and EC5v cells. We demonstrated that water reabsorption, from the apical (endolymphatic) to the basolateral (perilymphatic) compartments, was stimulated by dexamethasone in EC5v cells. This was accompanied by a glucocorticoid-dependent increase in AQP3 expression at both messenger RNA (mRNA) and protein level, presumably through glucocorticoid receptor-mediated AQP3 transcriptional activation. We show that glucocorticoids enhance AQP3 expression in human inner ear and stimulate endolymphatic water reabsorption. These findings should encourage further clinical trials evaluating glucocorticoids efficacy in Menière's disease.

Evelyne Ferrary and Marc Lombès contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00424-014-1629-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. Nevoux · S. Viengchareun · I. Lema · A.-L. Lecoq · M. Lombès (✉)
Faculté de Médecine Paris Sud, Inserm U693, 63 rue Gabriel Péri, Le Kremlin-Bicêtre 94276, France
e-mail: marc.lombes@u-psud.fr

J. Nevoux · S. Viengchareun · I. Lema · A.-L. Lecoq · M. Lombès
Faculté de Médecine Paris Sud, UMR-S693, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre 94276, France

J. Nevoux
Service d'ORL, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre 94275, France

J. Nevoux · E. Ferrary
Inserm, U867, Université Paris Diderot, Paris, France

M. Lombès
Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre 94275, France

Keywords Menière's disease · Hearing loss · Dexamethasone · Endolymph · Human utricle · Cochlea

Abbreviations

AQP	Aquaporin
DEX	Dexamethasone
DRB	5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole
GR	Glucocorticoid receptor
hPUC	Human primary utricle cells
MR	Mineralocorticoid receptor

Background

First described long time ago, Menière's disease is clinically characterized by three major fluctuating, recurrent, and invalidating symptoms composed of vertigo, hearing loss,

and tinnitus [22]. This disease remains a highly prevalent pathology, notably in Western countries, with a very variable incidence ranging from 3.5 to 513 per 100,000 as a function of studied population and aging, yet responsible for a high impact on quality of life and hearing function [2]. Appropriate diagnosis of the disease remains difficult due to the lack of definite radiological (even with 3-T MRI imaging) or electrophysiological characteristics. In this context, several clinical criteria (crisis number, low frequency hearing loss,...) to assess the diagnosis of Menière's disease have been proposed in 1995 by the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery [1]. Therapeutic management of Menière's disease is always difficult, and only symptomatic treatments dedicated to decrease vertigo crisis intensity and/or recurrence are proposed, notably diuretics or osmotic agents leading, however, to inconstant results [30].

The inner ear is composed of two independent fluid compartments: the perilymphatic and the endolymphatic compartments. Endolymph, which bathes the apical side of the sensory cells, is a unique fluid in the human body owing to its very specific composition consisting of low Na^+ (1 mmol/l) and high K^+ (170 mmol/l) concentrations, associated with a relatively high osmolality (330 mOsm/kg). The precise composition and regulation of this fluid is crucial for equilibrium (vestibular function) and hearing (cochlear function). Nevertheless, endolymph regulation is only partially known, especially concerning water transport (see review [12]).

Increase in endolymph volume, the so-called endolymphatic hydrops, was associated to Menière's disease [15]. Nevertheless, up to date, the origin of this cochlear fluid expansion remains largely unknown. In an animal model of hydrops following the surgical destruction of the endolymphatic sac, an intracranial inner ear structure involved in endolymph reabsorption, endolymphatic K^+ concentration, and osmolality decreased [35], suggesting that alterations in K^+ regulation and/or in water transport from perilymph to endolymph might constitute the determinants involved in the pathogenesis of the endolymphatic hydrops.

Since dysregulation of water transport could account for the generation of hydrops in inner ear, we investigated the role of aquaporins (AQPs), the water channel proteins assembled in tetramers to constitute a pore allowing transmembrane water transport, in endolymph homeostasis. In mammals, 13 members of AQP family have been identified [40]. In mouse inner ear, nine subtypes (AQP1 to 9) were characterized with different distribution as a function of cell types [12, 16, 36].

The aim of the present study was to investigate the role of aquaporin 3 (AQP3) in water transport into endolymph, and its regulation by glucocorticoids, a commonly used pharmacological drug in inner ear diseases [27]. For this purpose, we used the EC5v murine inner ear cell line, previously established in the laboratory, which exhibits functional properties of vestibular dark cells, responsible for endolymph

secretion in semicircular canal ampullae and utricle [38] and in which we demonstrated a high expression of AQP3 (present study). Interestingly, we demonstrated that K^+ transport was regulated in this cell line by vasopressin, ATP, and catecholamines [23].

In the present study, we clearly demonstrated in EC5v cells that dexamethasone (DEX) stimulates transepithelial water flux from apical to basolateral sides of these polarized epithelial cells. This effect was associated with transcriptional activation and expression of AQP3, an aquaporin that we identified in both human and murine inner ear tissue, as well as in EC5v cells. Considering that endolymphatic hydrops is the anatomical substratum of Menière's disease, the observation that glucocorticoids stimulate water absorption from the endolymphatic compartment opens interesting therapeutic perspectives in the management of Menière's disease.

Methods

Primary cultures of human inner ear cells

Human utricles were obtained after vestibular schwannoma surgery using translabyrinthine approach. All procedures were approved by the local ethics committee (cpp.idf 7), and all patients signed an informed consent form. After sampling, utricles were either immediately snap-frozen in liquid nitrogen for subsequent analyses or put in enriched culture medium (see below) for culture. In this latter case, utricle was carefully microdissected and human primary utricle cells (hPUCs) were thereafter expanded on collagen I-coated Petri dishes. Isolated epithelial cells were cultured in DMEM-HAM F12 medium supplemented with 20 % fetal calf serum (Biowest, Nuaillé, France), 2 mM glutamine, 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 1 % Fungizone (osmolality: 295 mosm/kg), at 37 °C in a humidified incubator with 5 % CO_2 . All reagents were from PAA (Velizy-Villacoublay, France).

Mouse immortalized cell lines

The EC5v inner ear (isolated from the ampulla of semicircular canals) and the KC3AC1 renal (from microdissected cortical collecting ducts) cell lines were established by a targeted oncogenesis strategy in mice. Both cell lines were cultured from passage 10 to 40, in an epithelial medium, as previously reported [23, 38, 41]. Cells were cultivated on collagen I-coated Petri dishes, or on Transwell filters (Costar, Brumath, France), when indicated. Under this latter condition, the transepithelial resistance was measured (EVOM2, Voltohmmeter, WPI, Sarasota, FL) and found to be above 1500 $\Omega \text{ cm}^2$, confirming a high tightness of the epithelial monolayer. To study corticosteroid actions, culture medium was replaced 48 h before the experiment by a minimal

medium devoid of serum, DEX, insulin, and epithelial growth factor (EGF). For some experiments performed on Transwell filters, the medium bathing the apical surface of the cells was replaced by an artificial medium mimicking endolymph composition (35 mM KHCO₃, 125 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 304 mosm/kg osmolarity, pH 7.4).

Immunohistochemical analyses

Mice were euthanized and temporal bone was harvested and fixed overnight in 4 % paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) before decalcification in 0.5 M EDTA (pH 7.4), for 5 days, on orbital table, at 4 °C. Thereafter, the temporal bone was dehydrated in 70 % ethanol and then embedded in paraffin. Five-micrometer thick sections were prepared, permeabilized with 0.1 % Triton X-100 diluted in PBS for 10 min at room temperature, and then rinsed with PBS. Sections were incubated in peroxidase blocking solution (3 % H₂O₂ in PBS) for 30 min to block endogenous peroxidase activity, rinsed with PBS, and incubated with 4 % horse serum blocking solution (ImmPress, Vector Labs, CliniSciences, Nanterre, France). Sections were subsequently incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal anti-AQP3 primary antibody (sc-20811, dilution 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). After extensive washes and incubation for 1 h at room temperature (RT) with anti-rabbit horse IgG secondary antibody (ImmPress Reagent Kit), AQP3 immunodetection was revealed using the AEC Substrate Chromogen (Dako, Trappes, France). Tissue sections were thereafter mounted on slides with Glycergel mounting medium (Dako). Immunolabeled sections were examined at ×20 magnification with an optical microscope (AX70 Provis, Olympus, Rungis, France).

Immunocytochemical analyses

For standard fluorescence microscopy, cells were cultured on glass coverslips (LabTek, Nunc, Roskilde, Denmark), fixed with 4 % PFA in PBS for 30 min, rinsed for 5 min with PBS, and then permeabilized with 0.1 % Triton X100 in PBS for 30 min before processing for immunofluorescence labeling. Cells were rinsed for 5 min with PBS then incubated for 1 h at RT in a blocking buffer composed of 5 % milk in PBS before they were incubated overnight with rabbit polyclonal anti-AQP3 antibody (dilution 1:200, Santa Cruz Biotechnology). Bound immunoglobulins were revealed after incubation for 30 min at RT with a goat anti-rabbit Alexa 546-labeled antibody (dilution 1:1000, Molecular Probes, Life Technologies, Saint-Aubin, France). Negative controls were performed by substituting primary antibody with the corresponding preimmune immunoglobulins from the same species. Glass coverslips were mounted with antifade gold (Molecular

Probes). Nuclei were labeled with DAPI staining (0.5 µg/µl) for 3 min at RT. Specific labeling of AQP3 was observed with an optical microscope.

For confocal microscope analyses, EC5v cells were grown on Transwell filters with complete epithelial medium on both sides. Cells were then rinsed with PBS and fixed for 15 min with 4 % PFA in PBS at RT. Thereafter, cells were rinsed in PBS and permeabilized with 0.5 % Triton X-100 in PBS for 30 min. Cells were rinsed for 5 min with PBS then incubated for 1 h, at RT, in a blocking buffer composed of 5 % milk in PBS. Finally, cells were incubated overnight with rabbit polyclonal anti-AQP3 antibody (dilution 1:200, Santa Cruz Biotechnology). Cells were then incubated in 5 % milk in PBS, for 45 min at RT, with the Alexa CY3 secondary antibody (dilution 1:1000, Molecular Probes). A postfixation in 4 % PFA for 10 min was performed. Specific labeling of AQP3 was observed with a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

Western blot analyses

Total protein extracts were prepared from EC5v cells cultured in the epithelial medium on collagen I-coated Petri dishes or Transwell filters. Briefly, cells were lysed as previously described [38] and protein concentrations were determined by the BCA method, and 30 µg of total protein were directly submitted to SDS-PAGE. After protein blotting on an Odyssey nitrocellulose membrane (LI-COR, Lincoln, NE), blots were incubated for 1 h, at RT, in a blocking buffer (5 % fat-free milk in TBS with 0.1 % Tween) before overnight incubation at 4 °C with a rabbit anti-AQP3 antibody (1:400 dilution, Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel) and a mouse anti- α -tubulin antibody (1:5000 dilution, Sigma-Aldrich). After extensive washes, blots were incubated with an IRDye 800-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:15,000 dilution, Perbio Science, Brebières, France) and an IRDye 680-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (1:15,000 dilution, Perbio Science) for 1 h, at RT. After washes, AQP3 and α -tubulin proteins were visualized with an Odyssey-Fc apparatus (LI-COR). Specific signals were normalized by the infrared fluorescence of α -tubulin signals, as determined by densitometry using the Image Studio software (LI-COR).

Gene expression analyses

Total RNA was extracted from cells with TRIZOL reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. Quantitative RT-PCR was performed as previously described [41]. After DNase I treatment (Biolabs, Evry, France), RNA was reverse-transcribed using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies). Samples were analyzed by quantitative RT-PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) with the

primers indicated in Supplementary Table 1 and a StepOne Plus real-time PCR system (Life Technologies). Reaction parameters were 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. For preparation of standards, amplicons were purified from agarose gel and subcloned into pGEM-T easy plasmid (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France), then sequenced to verify the identity of each fragment. Standard curves were generated using serial dilutions of linearized standard plasmids, spanning five orders of magnitude and yielding correlation coefficients >0.98 and efficiencies of at least 0.95 in all experiments. Standard and sample values were determined in duplicate from at least three independent experiments. Relative expression within a given sample was calculated as the ratio expressed as specific gene/18S and normalized to that obtained in control cells that was arbitrary set at 1.

Plasmid construct and transfection assays

A 1381 kb fragment of the promoter region of the human *AQP3* gene was amplified by PCR from genomic DNA extracted from human fibroblasts using specific primers (Supplementary Table 1), in which *XhoI* and *HindIII* restriction sites were introduced to facilitate cloning into the pGL4 basic vector (Promega). This plasmid construct (75 ng/well) was transfected into EC5v or KC3AC1 cells using the Lipofectamine 2000 reagent, together with the human glucocorticoid receptor (GR) plasmid (40 ng/well), and the Renilla vector (20 ng/well) (Promega), as an internal reporter plasmid control. Six hours after the transfection, medium was replaced by a minimum medium devoid of DEX and serum. The day after, cells were stimulated with 10^{-7} M DEX in the presence or absence of 10^{-6} M GR antagonist RU486, in minimum medium. Twenty-four hours later, cells were lysed in passive lysis buffer (Promega). Firefly and Renilla luciferase activities were measured by bioluminescence on a TriStar apparatus (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). Results were means±SEM and expressed as the ratio between Firefly and Renilla activities.

Measurement of transepithelial water transport

EC5v cells ($\sim 10^6$) were seeded on Transwell filters (12-mm diameter) and cultured for 7 days in the epithelial medium. Forty-eight hours before the experiment, the medium was removed, cells were rinsed with PBS, and fresh minimal epithelial medium was added. Eighteen hours before the experiment, cells were stimulated with DEX (10^{-7} M), with or without RU486 (10^{-5} M). The day of the experiment, 55 or 5 kBq/well of $^3\text{H}_2\text{O}$ (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO,

specific activity: 1 mCi/ml) diluted in fresh minimal epithelial medium (basolateral) or artificial endolymph (apical), respectively, was added either in the basolateral compartment (100 μl) or the apical one (10 μl). Time course of $^3\text{H}_2\text{O}$ flux was evaluated by sampling 5 μl at 1, 2, 5, 10, and 15 min from the apical compartment for determination of basolateral to apical water flux, or by sampling 50 μl at 1, 2, 5, 10, and 15 min from the basolateral side for determination of apical to basolateral water flux. For each filter, radioactivity was determined in duplicate. Radioactivity was counted by scintillation counting in 3-ml scintillation liquid (Ultima Gold, Perkin Elmer, Courtabeouf, France). Water transport (pl) was calculated as the total amount of radioactivity in the sampled compartment at t time, divided by the radioactive concentration in the loading compartment measured at $t=0$, assuming a negligible decrease of $^3\text{H}_2\text{O}$ in this compartment over 15 min. For each experiment, four independent filters were studied, and results are expressed as mean±SEM of 1 to 3 independent experiments, i.e., 4 to 12 filters.

In vivo investigations in mice

Adult wild-type male mice (F1, 129v x B6D2 strains) (5 series of 2–6 animals per condition, control condition $n=14$, DEX condition $n=18$) were kept on a 12:12 h light-dark cycle in a temperature-controlled colony room with ad libitum access to food and tap water, according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health. The animal facility was granted approval (C94–043–12) by the Ministère de l'Agriculture, France. All procedures were approved by the local ethics committee "Consortium des Animaleries Paris Sud" (2012–021). The animals received an intraperitoneal i.p. injection of vehicle (<2 % ethanol in PBS) or DEX (1 mg/kg BW, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Then 6 to 16 h later, animals were euthanized, and their kidneys and inner ears were collected and snap-frozen in liquid nitrogen for subsequent gene expression analyses.

Statistical analyses

Data are expressed as mean±SEM. Student t test, non-parametric Mann-Whitney, or Kruskal-Wallis multiple comparison test followed by a posttest of Dunn were used to determine significant differences among groups with the use of the computer software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Best fitting curves were compared by extra sum-of-squares F test. A P value of 0.05 was considered as statistically significant (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$).

Results

Identification of AQP in inner ear

To identify which AQP subtypes were potentially involved in water transport in inner ear, we first compared, by RT-PCR, expression of all AQP subtypes in the murine EC5v vestibular cell line, and in mouse inner ear and kidney samples. As presented in Table 1, we showed that only *AQP3*, *AQP6*, and *AQP7* were expressed in EC5v cells, whereas all *AQP* subtypes were detected in native murine inner ear and kidney. By using quantitative real-time PCR, we showed that *AQP3* messenger RNA (mRNA) levels were highly expressed in EC5v cells, approximately ten times higher as compared to *AQP6* and *AQP7* mRNA expression (0.5 amol/fmol of 18S for *AQP3* compared to 0.08 for *AQP6*, and 0.05 for *AQP7*, respectively). Interestingly, we noted that *AQP2*, the AQP that is tightly regulated by arginine vasopressin, was not expressed in these inner ear cells, although we previously reported the presence of the vasopressin type 2 receptor (V2R) in EC5v cells [5]. Altogether, these observations prompted us to focus our investigations on AQP3 expression and function in inner ear.

Characterization and regulation of AQP3 in human inner ear cells

Given our interest for Menière's disease, we next investigated whether AQP3 was expressed in human inner ear. To this aim, we generated primary cultures of human utricle cells (hPUCs) obtained during vestibular schwannoma surgery, and wondered whether *AQP3* was expressed in such a cell-based system. hPUCs displayed an epithelial-like morphology (data

Table 1 Identification of *AQP* mRNA in EC5v cells, and in mouse inner ear and kidney

	EC5v	Inner ear	Kidney
<i>AQP1</i>	–	+	+
<i>AQP2</i>	–	+	+
<i>AQP3</i>	+	+	+
<i>AQP4</i>	–	+	+
<i>AQP5</i>	–	+	+
<i>AQP6</i>	+	+	+
<i>AQP7</i>	+	+	+
<i>AQP8</i>	–	+	+
<i>AQP9</i>	–	+	+

Total RNAs were extracted from inner ear cell line (EC5v), native mouse inner ear tissue, and kidney. RT-PCR was performed as described in the "Methods" section and in Supplementary Table 1

+ Indicates a positive amplification; – indicates the absence of specific amplified fragment

not shown), similar to that of the EC5v cells. More importantly, we examined by RT-PCR the expression of genes potentially involved in the regulation of water transport and notably major players of the corticosteroid and vasopressin signaling pathways. Thus, we were able to show that hPUCs, as well as human native utricle samples, expressed transcripts for mineralocorticoid receptor (MR), glucocorticoid receptor (GR), V2R, and AQP3 (Fig. 1a). We next addressed the question on whether *hAQP3* expression could be modulated upon glucocorticoid exposure. To this end, we incubated hPUC with 10^{-7} M DEX for 6 h before assessing *hAQP3* mRNA levels by RT-qPCR. As presented in Fig. 1b, we demonstrated that glucocorticoid treatment induced a significant 3.5-fold increase in *hAQP3* mRNA levels in human inner ear utricle cells.

Characterization and topology of AQP3 protein in mouse inner ear

In order to further explore the regulatory mechanisms controlling water transport in the inner ear, cellular and animal experimental models were exploited using various complementary approaches. We first studied the presence and the subcellular localization of AQP3 protein in EC5v cells and in mouse inner ear. Western blot analysis revealed the existence of three major bands for AQP3 in EC5v cells with an apparent molecular weight of 27, 33, and 40 kDa (Fig. 2a, left panel). Such bands are specific since they disappeared when lysates were incubated with the AQP3 antigenic peptide (Fig. 2a, right panel), and might be the result of *O*-glycosylation posttranslational modifications, as already reported [18]. Similar signals were observed in positive controls such as mouse kidney tissue, and the murine renal tubular cells (KC3AC1), originating from the cortical collecting duct [41], although only the higher molecular weight band was detected in these renal samples. Altogether, these results indicate that AQP3 expression and its posttranslational modifications are likely highly cell-specific. Moreover, immunocytochemical experiments performed in EC5v cells grown on Petri dishes revealed a positive AQP3 protein labeling excluding the nuclear compartment (Fig. 2b, left panel). Confocal microscopy imaging of EC5V cells, grown on Transwell filters to mimic polarized epithelium, was consistent with a cytoplasmic and a cell surface localization of AQP3 (Fig. 2b, right panel). The Z-stack images enabled us to clarify the topology of AQP3 protein, and indicated both a basolateral and apical membrane staining as well as an intracellular labeling in EC5v inner ear cells.

We also performed immunohistochemical experiments on mouse inner ear tissue to localize AQP3 protein. As shown in Fig. 2c, we detected AQP3 expression in the

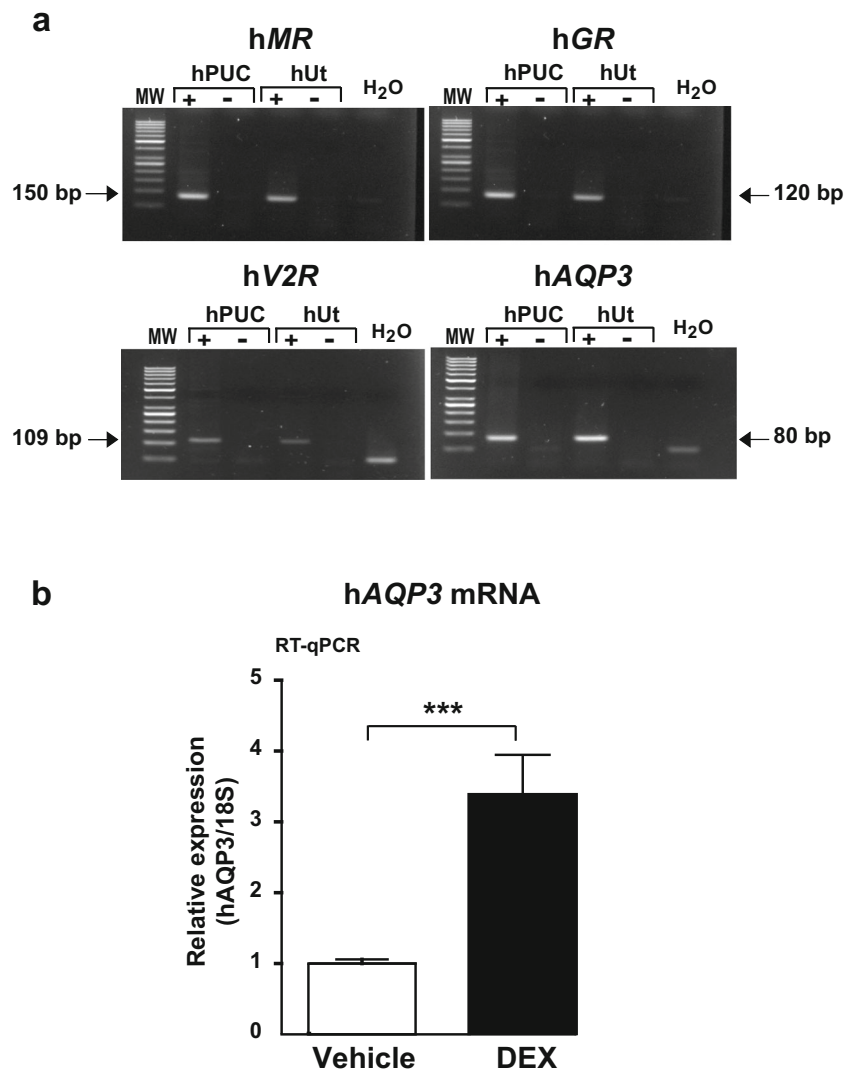


Fig. 1 Molecular and functional properties of the human utricle cells. Human inner ear cells, originating from utricle of patients operated on for vestibular schwannoma, were cultured in epithelial medium (see the “Methods” section). **a** Expression of mRNA of human mineralocorticoid receptor (*hMR*), human glucocorticoid receptor (*hGR*), human vasopressin receptor type 2 (*hV2R*), and *hAQP3* by RT-PCR in human primary utricle cells (*hPUC*), and human native utricle (*hUt*) sampled during vestibular schwannoma surgery. Total RNAs were extracted and reverse-transcribed with random primers (see Supplementary Table 1) in the presence (+) or absence (–) of the reverse transcriptase. cDNAs were then amplified as described in the “Methods” section. RT-PCR

experiments allowed detection of 150, 120, 109, and 80 bp amplicons amplified with specific primers for *hMR*, *hGR*, *hV2R*, and *hAQP3* genes, respectively. **b** *hAQP3* mRNA expression in *hPUC* upon DEX treatment. *hPUC* were incubated in minimal medium 24 h prior to the experiment, and then incubated with DEX (10^{-7} M) for 6 h. Total RNAs extracted from *hPUC* cells were reverse-transcribed, and cDNA submitted to PCR with *hAQP3* primers. For each experiment, *hAQP3* expression was normalized with 18S expression, and the expression under DEX was normalized with that measured in control condition (vehicle), i.e. in the absence of hormone. Data are mean±SEM of ten independent determinations. *** $P < 0.001$ (Mann-Whitney *U* test)

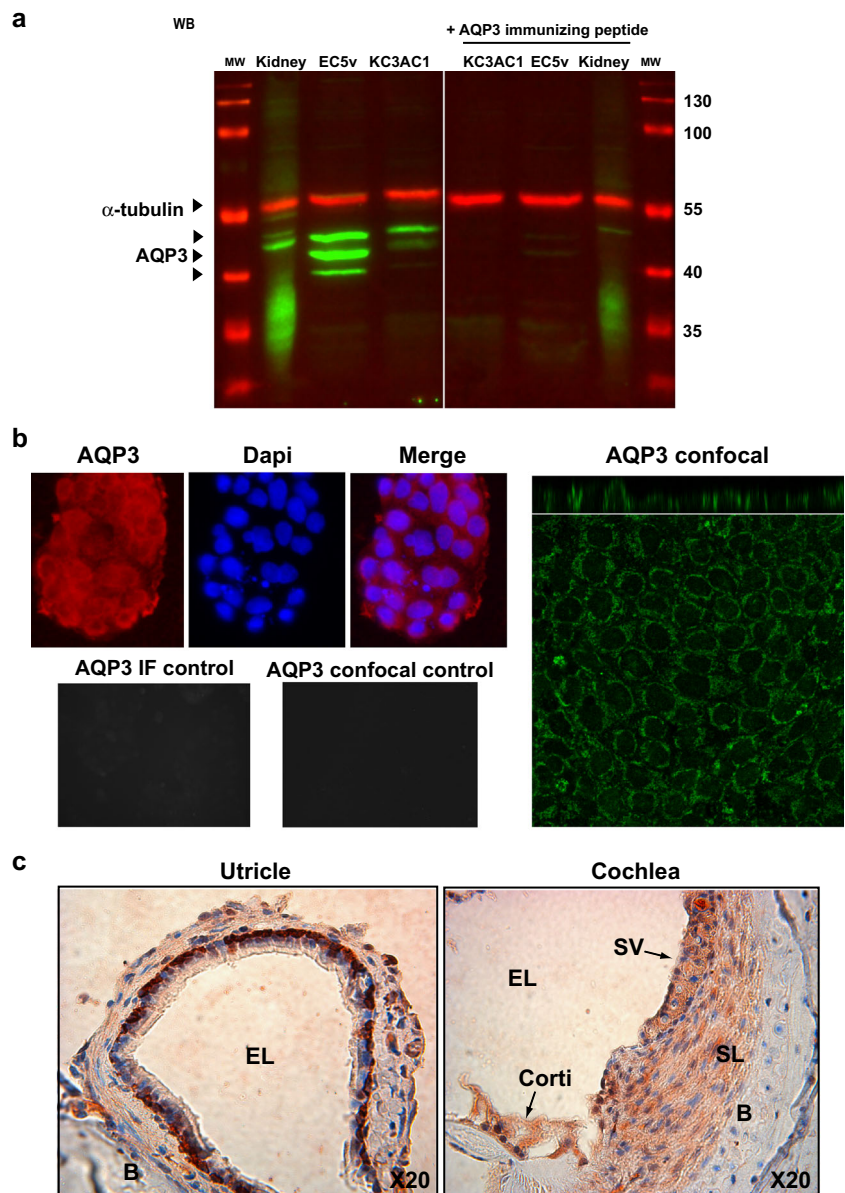
lateral wall of the cochlea (right panel), and in non-sensory epithelial cells of the utricle (left panel), involved in the endolymph secretion.

Collectively, we demonstrated that human and mouse inner ear cells express molecular determinants required for water transport. Our results also indicated that EC5v epithelial vestibular cells do express the pivotal water channel AQP3 both at the messenger and protein levels, thus constituting a suitable cell-based system to examine the hormonal regulation of water transport in the inner ear.

Glucocorticoids stimulate water transport in EC5v cells

To study transepithelial water transport, EC5v cells were grown on filters in order to mimic vectorial hydroelectrolytic transports through polarized epithelial cells, and to establish well-defined apical as well as basolateral compartments whose medium compositions could be modified at will. Using such experimental settings, ³H₂O transport was analyzed under symmetric conditions in which both cell sides were bathed with minimal medium, or asymmetric conditions where

Fig. 2 Characterization and localization of mAQP3 protein in EC5v cells and mouse inner ear. **a** Western blot analysis was performed on mouse kidney samples, murine EC5v, and KC3AC1 cells, a mouse tubular kidney cell line used as control, as described in the “Methods” section by using anti-AQP3 antibody (*left panel*), or in the presence of the corresponding immunizing peptide (final concentration 1 $\mu\text{g/ml}$) (*right panel*). Cells were grown on Petri dishes. α -tubulin was used as a loading control. **b** Immunodetection of mAQP3 in EC5v cells cultured on coverslips for standard fluorescent microscopy (*first three upper left panels*), or on filters for confocal microscopy (*right panel*). The negative controls are presented (*two lower left panels*). **c** Immunohistochemical detection of AQP3 in utricle and cochlea from mouse inner ear. AQP3 staining was observed in the non-sensory epithelium of the mouse utricle, presumably the dark cells involved in endolymph secretion. In the cochlea, AQP3 was detected in the lateral wall including the spiral ligament (SL) and the stria vascularis (SV), as well as the sensory organ of Corti (Corti). Note that the bone (B) surrounding the inner ear was negatively stained. EL endolymph



artificial endolymph was placed in the apical compartment, and minimal medium in the basolateral one. Under control conditions, water fluxes measured in EC5v cells from apical to basolateral (87.6 ± 3.44 pl, 10 min after $^3\text{H}_2\text{O}$ application) or from basolateral to apical sides (85.0 ± 2.38 pl, 10 min after $^3\text{H}_2\text{O}$ application) were similar, irrespective to the asymmetric (Fig. 3a, b) or symmetric (Fig. 3c, d) experimental settings, indicating water transport equilibrium despite the slight osmolarity difference between apical and basolateral media that could drive water transport in EC5v cell monolayer under asymmetric condition. Interestingly, DEX exposure (10^{-7} M), 18 h before water transport assessment, resulted in a significant increase in apical to basolateral water transport, detected as early as after 1 min to reach ~ 1.25 -fold increase at 10 min. More importantly, this glucocorticoid-stimulated

water transport was observed only under asymmetric conditions, and was fully inhibited by RU486, a specific GR antagonist (Fig. 3a, b), thus demonstrating the involvement of GR-mediated signaling in the regulation of vectorial water reabsorption through inner ear cells from the apical to the basolateral compartment.

Glucocorticoids enhance AQP3 expression in inner ear

To further explore the regulatory mechanisms underlying this glucocorticoid-stimulated transepithelial water transport, AQP3 expression was analyzed upon glucocorticoid exposure. EC5v cells grown on Petri dishes were incubated, in minimum medium for 6 h, with DEX (10^{-7} M) in the absence or presence of RU486 (10^{-5} M), or of the transcription

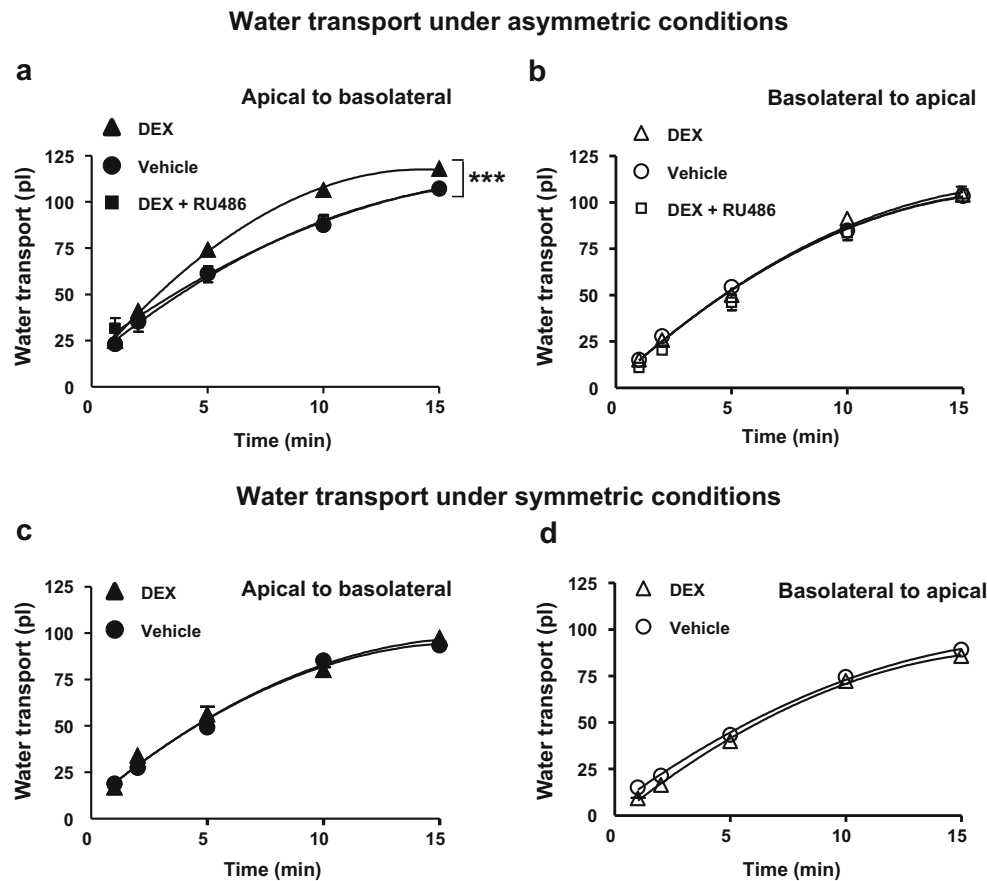


Fig. 3 Characterization of water transport in EC5v cells. EC5v cells were cultured on filters in minimal medium for 48 h before the experiment. Apical solution was changed for an additional 18-h period, to artificial high K^+ endolymph solution (asymmetric condition, **a**, **b**) or fresh minimal medium (symmetric condition, **c**, **d**). DEX (10^{-7} M), without or with RU486 (GR antagonist, 10^{-5} M), was added in both apical and basolateral compartments. Trans epithelial water transport (pl) was calculated using 3H_2O added either in the apical compartment (**a**, **c**), or in the basolateral compartment (**b**, **d**). Radioactivity was measured 1 to 15 min after the addition of 3H_2O (see the “Methods” section). Data are mean \pm SEM of 4

determinations for symmetric conditions (1 experiment, 4 independent wells), or of 12 determinations for asymmetric conditions (3 experiments, 4 independent wells each). The estimated water transport was calculated as a polynomial of the second-order equation ($y = a + bx + cx^2$, where y in pl and x in min) that best fitted with the experimental data. The equations of the curves are given in Supplementary Table 2. DEX significantly stimulated ($***P < 0.001$, extra sum-of-squares F test) apical to basolateral 3H_2O transport under asymmetric conditions as shown in panel **a**. Please note that SEM are given in the figures, but may be not visible when included in the symbols

inhibitor, 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB; $10 \mu\text{g/ml}$). Glucocorticoid treatment elicited a significant \sim threefold increase in *AQP3* mRNA expression (Fig. 4a). This effect was fully inhibited by DRB, a result consistent with a transcriptional activation of mouse *AQP3* gene. Under asymmetric condition, i.e., when EC5v cells were cultured on filters with artificial endolymph at the apical side of the cells, *AQP3* mRNA levels were also stimulated (2.5-fold) by DEX, and this stimulation was inhibited by RU486 (Fig. 4b). These observations provided additional support for a glucocorticoid receptor-mediated transcriptional control of *AQP3* expression in inner ear cells. Likewise, Western blot analysis showed that *AQP3* protein was also detected as the three major molecular weight bands at 27, 33, and 40 kDa (Fig. 4c), whose quantification revealed a 1.5-fold increase in the presence of DEX ($P < 0.001$, Mann-Whitney test), an effect again inhibited by RU486 (data not shown). Taken together,

these results clearly demonstrated that DEX stimulated *AQP3* expression both at mRNA and protein levels in vestibular EC5v cells.

Glucocorticoids transactivate *AQP3* promoter in inner ear

We explored the 1381 pb upstream of the 5'-region of transcription initiation site of *hAQP3* gene. This promoter sequence contained one putative *cis*-regulatory motif consisting of one hemi-HRE (GGTACA at 748 bp from the transcription initiation start site). The promoter activity was significantly enhanced by 1.4-fold factor in EC5v cells in the presence of DEX (Fig. 5a). This activation was mediated by GR as demonstrated by RU486 inhibitory effect. This effect was not observed in renal KC3AC1 cells (Fig. 5b). These results demonstrate that glucocorticoids regulate *AQP3* gene expression via a transcriptional activation mechanism involving GR.

Fig. 4 Regulation of mAQP3 expression by DEX in EC5v cells. **a, b** GR-dependent regulation of mAQP3 mRNA expression in EC5v cells. mAQP3 mRNA expression was determined by RT-qPCR as described in the “Methods” section. EC5v cells grown on Petri dishes (**a**) or on filters under asymmetric condition (**b**) were treated with DEX (10^{-7} M), in the absence or presence of RU486 (10^{-5} M), or in the absence or presence of DRB (10 μ g/ml), for 6 h in minimal medium. Results are expressed as mean \pm SEM, $n=15$. Values obtained in vehicle were arbitrarily set to 1 for each experiment. *** $P<0.001$, * $P<0.05$ (one-way ANOVA followed by a post-Dunn’s multiple comparison test). **c** GR-dependent regulation of mAQP3 protein expression in EC5v cells. Western blot analysis (*left panel*) was performed on proteins extracted from EC5v cells cultured on Petri dish by using anti-AQP3 antibody. α -tubulin was used as loading control. Quantification of specific signals was performed using the Image Studio software (LI-COR) as shown on right panel. AQP3 signals were normalized to α -tubulin signals for each experiment. Values obtained in untreated cells were arbitrarily set to 1 for each experiment. Results are expressed as mean \pm SEM, $n=4$ to 7 independent determinations. *** $P<0.001$ (Mann-Whitney U test)

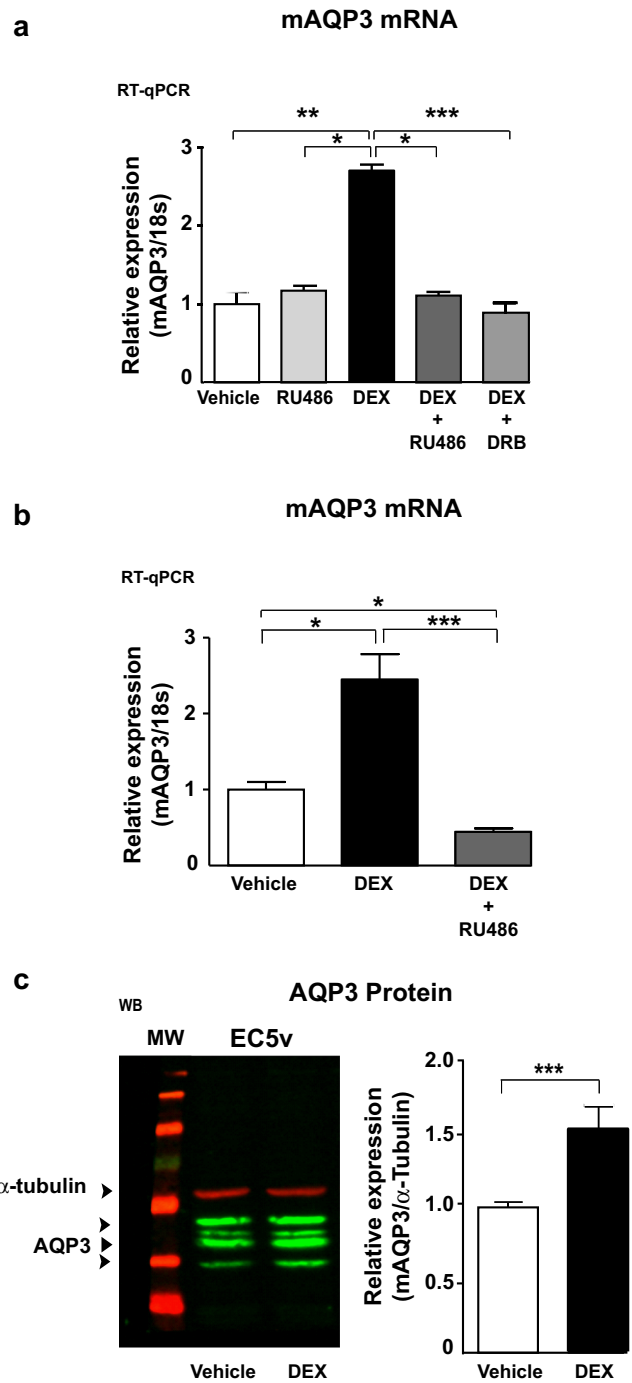
This effect was also tissue-specific and only observed in inner ear cells.

Glucocorticoids stimulate *in vivo* AQP3 expression in mouse inner ear

To translate our results into *in vivo* models, adult male mice were treated or not with DEX (1 mg/kg *i.p.*). As illustrated in Fig. 6a, *AQP3* mRNA levels in the inner ears of untreated mice were clearly in the same range, whereas *AQP3* mRNA expression widely varied in the inner ears of DEX-treated animals (F test to compare variances: $F=11.58$, $P<0.0001$), indicating that the variances of these two non-Gaussian populations significantly differ. By arbitrarily a \sim twofold increase in mRNA expression as a criterion to define a stimulatory response, 6 out of 18 DEX-treated animals were considered as DEX-responder animals (Fig. 6a). The reason of such divergent responses are presently unclear, but it could be hypothesized that glucocorticoid sensitivity and/or AQP3 responsiveness may be somehow highly dependent on animal status. As illustrated in Fig. 6b, the DEX-responder mice exhibited a significant \sim threefold increase in *AQP3* mRNA levels in inner ear (2.9 ± 0.45 , $n=6$, vs 1.0 ± 0.12 in control mice, $n=9$, $P<0.001$), whereas their renal AQP3 expression remained unchanged (Fig. 6b), indicating that glucocorticoid-regulated *AQP3* expression might be highly dependent upon the cell-specific context, consistent with cell-specific AQP3 promoter activation demonstrated above and with previous reports [18].

Discussion

The electrochemical composition of endolymph, as well as its volume, has to be tightly regulated to ensure correct hearing and balance. In Menière’s disease, the presence of



endolymphatic hydrops, an endolymphatic compartment dilation, strongly suggests an alteration of water transport, i.e., an increase in endolymph secretion and/or a decrease of its reabsorption. In the present study, we focused on aquaglyceroporin AQP3 that was unambiguously detected in human utricle, and was highly expressed in both mouse inner ear and murine EC5v vestibular cells. We demonstrated that water transport reabsorption in inner ear was stimulated by

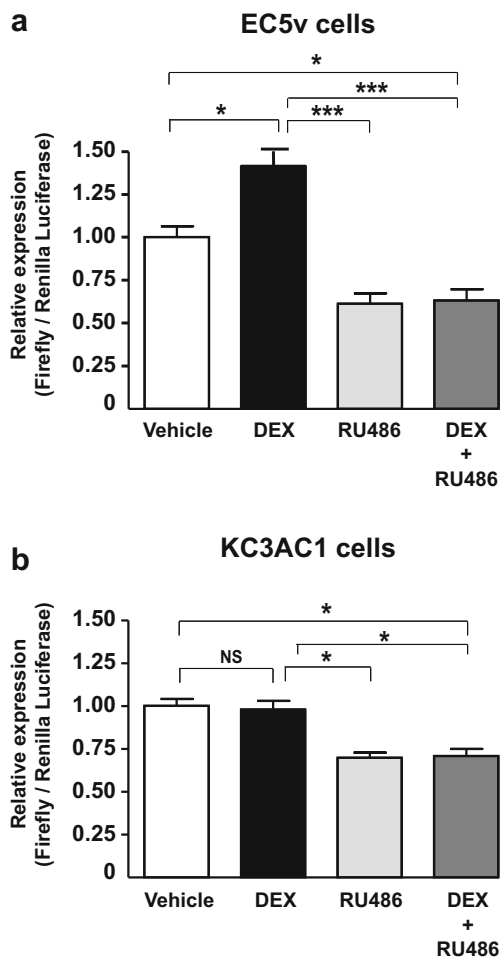


Fig. 5 Glucocorticoid-dependent transactivation of hAQP3 promoter. GR-dependent transactivation of hAQP3 promoter in EC5v cells (a) and in KC3AC1 cells (b). Twenty-four hours prior transfection, EC5v (a) or KC3AC1 cells (b) were incubated in minimum medium and then transfected with phAQP3-Luc vector (75 ng/well in 24-well plate) in the presence of pcDNA3.1human GR expression plasmid (40 ng/well) together with the internal transfection control pRenilla-Luc (20 ng/well) (Promega). Cells were then incubated for an additional 24-h period with vehicle, DEX (10^{-7} M), RU 486 (10^{-5} M), or in combination of both. Luc activity of phAQP3-Luc significantly increased in EC5v but not in KC3AC1 cells. This DEX-stimulated of Luc activity was inhibited in the presence of RU486, indicating that human GR transactivates the 1.3 kb human AQP3 promoter fragment in vestibular cell but not in renal cells. Values are means \pm SEM from four independent experiments performed in quadruplicates. (Nonparametric *U* Mann-Whitney tests: * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001)

glucocorticoids, presumably, at least in part, via upregulation of AQP3 expression.

Pathophysiology of Menière's disease: role of water transport and AQP

Menière's disease is clearly related to an altered regulation of endolymph composition, volume, and/or pressure [30]. However, the pathophysiological mechanisms remain to be

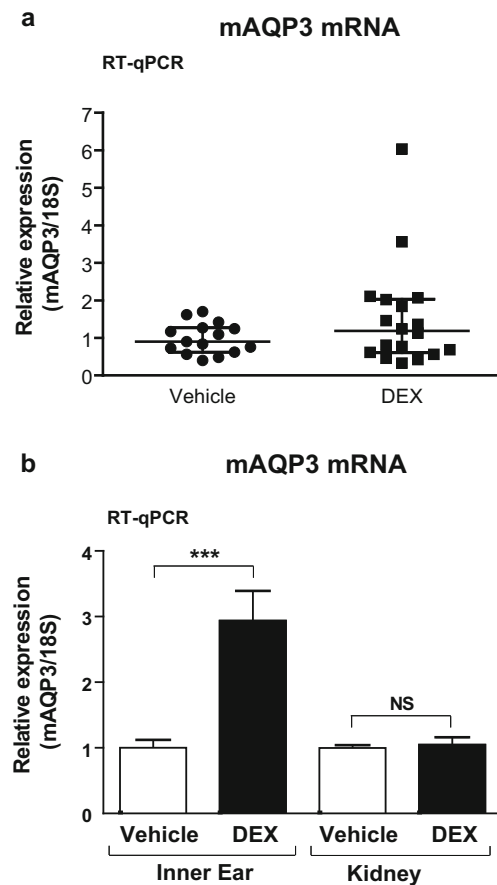


Fig. 6 In vivo regulation of mAQP3 expression by DEX in inner ear and kidney. Adult male mice (five series of 2–6 animals per condition) received an i.p. injection of vehicle ($n=14$) or DEX (1 mg/kg BW; $n=18$). Six to 16 h later, animals were euthanized and their inner ears from both sides and renal samples were collected, snap-frozen, and proceeded for RT-qPCR analysis. Expression of mAQP3 gene was normalized to 18S rRNA levels as described in the “Methods” section. **a** mAQP3 expression in inner ears of vehicle or DEX-treated mice. Individual values are presented. For each series of experiment, values measured in control mice were arbitrarily set to 1, and those obtained in DEX-treated mice were calculated accordingly. AQP3 mRNA expression in control animals was 3.8 ± 0.4 amol of AQP3/fmol of 18S (median \pm interquartile). **b** Tissue specificity of DEX-stimulated AQP3 expression. mAQP3 expression was measured in inner ear and kidney of vehicle or DEX-treated mice. In the 6 DEX-responder animals (out of 18 DEX-treated mice) in which mAQP3 expression in the inner ear was increased by a ~twofold factor ($\times 2.9\pm 0.45$, $n=6$, vs $\times 1.0\pm 0.12$, $n=9$, *** P <0.001), mAQP3 mRNA expression remained unchanged in the kidney of the same animals (NS not significant, Mann-Whitney *U* test). Of note, relative mAQP3 expression was approximately 25 times lower in the inner ear (3.8 ± 0.4 amol/fmol of 18S) than in the kidney (116.4 ± 9.4 amol mAQP3/fmol 18S)

determined. For instance, only half of overt Menière's disease patients presented with a local high pressure [7], such an observation that could explain why numerous therapeutics proposed to patients failed to bring coherent and reproducible results. For example, with respect to the endolymphatic hydrops, drugs known to modify water exchanges, such as diuretics and osmotic agents (glycerol and mannitol), often led to inconsistent effects [26].

Aquaporins are water channel proteins, ubiquitously expressed in different cell types of the inner ear (for review, see [12]). Herein, we show that *AQP1* to *9* are all expressed in the mouse inner ear at the mRNA level (see Table 1). Interestingly, AQP1 and AQP3 are not expressed in the sensory structures but are clearly detected in structures involved in both endolymph secretion (lateral wall of the cochlea, dark cells and non-sensory epithelium of the utricle, and semicircular canal ampullae) and reabsorption (endolymphatic sac). In the present study, we localized AQP3 protein in stria vascularis, spiral ligament, and outer sulcus cells in cochlea, and in non-sensory epithelial cells in utricle.

AQP3, *AQP6*, and *AQP7* mRNA were detected in murine EC5v vestibular cells, with a clear higher expression of *AQP3* compared to *AQP6* and *AQP7*. This finding is in accordance with the results of Lopez et al. [19] who reported AQP6 expression in sensory epithelium of crista ampularis, and those of Huang et al. [16] who described AQP7 expression in stria vascularis, utricle, and saccule, but not in semicircular ampullae. Among the 13 AQP identified in mammals, AQP3 (and also AQP7 and AQP9) is highly permeable to solutes (e.g., glycerol, urea), in addition to water. The functional significance of such permeability is not clearly defined, but this transport ability may be linked to the beneficial therapeutic and diagnosis effect of glycerol injection in patients with Menière's disease [5]. Recent clinical data suggest the implication of AQP3 in Menière's disease. Indeed, intriguingly, one synonymous sequence variation (c.105C>G in exon 1, p:L35L) has been reported in *AQP3* gene in one third of patients with Menière's disease ($n=34$) but not in control patients ($n=100$) [8]. Furthermore, genetic data revealed that this sequence variation had an allele frequency of approximately 24 % [4], [National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project (ESP) database (Exome Variant Server 2012 NHLBI GO ESP, Seattle, WA. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), and in the 1000 Genomes Project Database], thus excluding a prominent role of this variant in Meniere's disease. However, one cannot rule out the implication of other *AQP3* polymorphisms such as those recently described for Gil, a major blood group number 29 encoded by *AQP3* gene [28] to predict or modulate therapeutic responses.

Water permeability of the cochlear epithelium appears to be very high in vivo. In rats, intravenous administration of $^3\text{H}_2\text{O}$ led to its rapid entry in perilymph and endolymph compartments within few minutes [33]. Similar rapid water transport kinetics were observed across polarized EC5v vestibular cell monolayers, since $^3\text{H}_2\text{O}$ fluxes from either basolateral or apical compartments were measured as early as after 1 min. Despite these rapid water exchanges, labyrinthine epithelium is also able to maintain a ~ 50 mosm/l osmotic gradient between cochlear endolymph and perilymph or plasma [34], this osmotic gradient being

decreased in experimental endolymphatic hydrops induced by the anatomical destruction of the endolymphatic sac in guinea pigs [35]. Altogether, these findings open the possibility to modulate water transport in the inner ear by pharmacological drugs.

Therapeutic potential of glucocorticoids in Menière's disease

Along with therapeutic interventions proposed for Menière's disease, a recent Cochrane review demonstrated the efficacy of intratympanic steroids on both frequency and severity of attacks of vertigo in Menière's disease [27], raising the question as to whether and how glucocorticoids could affect water transport and AQP expression in the inner ear.

Herein, we clearly demonstrated that DEX, a potent glucocorticoid receptor agonist, not only stimulated vectorial water reabsorption from the apical compartment to the basolateral side of vestibular EC5v cells under asymmetric culture conditions mimicking in vivo physiology but also induced an upregulation of AQP3 expression both at mRNA and protein levels in murine vestibular cells, as well as in human utricle cells. To the best of our knowledge, this is the first report that clearly demonstrates a glucocorticoid-stimulated *AQP3* expression in the human inner ear. Consistent with our present study performed in mouse and human inner ear cells, DEX injected in the endolymphatic sac [17] or i.p. [14] specifically increased transcript levels of *AQP3* but not of other AQP subtypes, in the rat inner ear in a dose- and time-dependent manner. Interestingly, AQP3 expression was also regulated in various water transporting epithelia such as the kidney [11], the lung [24, 37], the intestine [32], and the human bladder urothelium [29]. However, the regulatory factors controlling AQP3 expression greatly varied upon the considered cell type and species. It has been reported that corticosteroids [6, 10, 37, 43], and vasopressin [25] may affect some but not all AQP expression. For instance, AQP3 expression was upregulated by aldosterone but not DEX in renal cells [18], and by hyperosmolality in human urothelium [29]. Along the same line, *AQP3* mRNA levels increased in the kidneys and gills of fish in response to hyperosmotic challenge during freshwater to seawater adaptation [9, 39, 42]. Thus, considering that stimulation of AQP3 expression and function by glucocorticoids is very likely highly dependent of the cell type and its polarization status, further experiments are needed in order to clarify whether and how glucocorticoids regulate AQP transcription, mRNA, and protein stability, as well as membrane localization, in the inner ear.

However, a transcriptional activation of *AQP3* gene by GR is very likely given that the transcription inhibitor DRB prevents DEX-stimulated AQP3 mRNA and protein expression in EC5v cells, even in the absence of a classical consensus GRE within 1 kb of AQP3 promoter [31].

The mechanism by which glucocorticoids might stimulate active water fluxes concerns the membrane sorting of AQP3 protein [11, 13] that seems to be determined by specific motifs present in the cytoplasmic tail of AQP3 [3]. Furthermore, basolateral diffusion of AQP3 was acutely increased upon forskolin exposure mimicking short-term AVP stimulation in collecting duct cells [21]. It remains to clarify whether and how AQP3 is localized in apical and basolateral membrane of the endolymph secretory cells. Indeed, an adequate sorting and delivery of this water transporter AQP3 to the plasma membrane appears to be essential for maintaining endolymphatic homeostasis. Alteration of such delivery might also represent an important pathophysiological event involved in the pathogenesis of Meniere's disease.

Finally, our results may have important pathophysiological implication with regards to Meniere's disease treatment that included dietary guidelines, medical drugs, and at the end, destructive strategies (chemical or surgical labyrinthectomy, vestibular neurectomy). Given that the frequency and severity of attacks of vertigo in Meniere's disease are reduced by intratympanic steroids [27], we propose a new paradigm for Meniere's disease treatment in which glucocorticoids stimulate water reabsorption from endolymph to perilymph, such as vectorial AQP3-mediated water flux being expected to reduce or cure the endolymphatic hydrops prevailing during Meniere's disease crisis. Our *in vivo* studies in mice provide additional support for this hypothesis. However, the heterogeneous pattern of AQP3 responses to glucocorticoid administration may be anticipated in Meniere's patients owing to the already well-recognized heterogeneous therapeutic responses that may be explained by GR polymorphisms associated with variable sensitivity to glucocorticoid actions [20].

Collectively, we show for the first time that glucocorticoids enhance AQP3 expression in human inner ear and stimulate endolymphatic water reabsorption. This observation should open new clinical trials in Meniere's disease to assess the efficacy of glucocorticoids, and to determine whether such novel therapeutic option may exert beneficial effects upon number and severity of acute crisis, and subsequently preserve hearing function.

Acknowledgments This work was supported by grants from Inserm, Université Paris-Sud, Université Paris Diderot, European Section of Aldosterone Council (ESAC), and Agence Nationale de la Recherche (ANR 11-BSV1-028-01). JN was a recipient of Société Française d'Oto-Rhinolaryngologie (SFORL) fellowship, and IL is a recipient of CORDDIM Cardiovasculaire-Obésité-Rein-Diabète-Domaine d'Intérêt Majeur (Région Ile-de-France) fellowship. The authors are indebted to G. Meduri, J. Bouligand, P. Leclerc, O. Trassard, N. Bâ, and M. Messina for their help. The authors also acknowledged the access to the facilities of the Institut Biomédical de Bicêtre/Institut Fédératif de Recherche 93, Le Kremlin Bicêtre, France).

Ethical standards The authors declare that the experiments comply with the current laws of France.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Authors' contributions JN, SV, EF, and ML designed the study; JN, SV, IL, AL, EF, and ML performed the experiments; JN, SV, EF, and ML analyzed the data; and JN, EF, and ML wrote the paper. All authors edit and approve the present manuscript.

References

- (1995) Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113:181–5
- Alexander TH, Harris JP (2010) Current epidemiology of Meniere's syndrome. *Otolaryngol Clin N Am* 43:965–970. doi:10.1016/j.otc.2010.05.001
- Arnsperg EC, Sundbye S, Nelson WJ, Nejsum LN (2013) Aquaporin-3 and aquaporin-4 are sorted differently and separately in the trans-Golgi network. *PLoS One* 8:e73977. doi:10.1371/journal.pone.0073977
- Bahamontes-Rosa N, Tena-Tomas C, Wolkow J, Kreamsner PG, Kun JF (2008) Genetic conservation of the GIL blood group determining aquaporin 3 gene in African and Caucasian populations. *Transfusion* 48:1164–1168. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01683.x
- Ban JH, Lee JK, Jin SM, Lee KC (2007) Glycerol pure tone audiometry and glycerol vestibular evoked myogenic potential: representing specific status of endolymphatic hydrops in the inner ear. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264:1275–1281. doi:10.1007/s00405-007-0370-5
- Ben Y, Chen J, Zhu R, Gao L, Bai C (2008) Upregulation of AQP3 and AQP5 induced by dexamethasone and ambroxol in A549 cells. *Respir Physiol Neurobiol* 161:111–118. doi:10.1016/j.resp.2007.12.007
- Bouccara D, Ferrary E, El Garem H, Couloigner V, Coudert C, Sterkers O (1998) Inner ear pressure in Meniere's disease and fluctuating hearing loss determined by tympanic membrane displacement analysis. *Audiology* 37:255–261
- Candrea C, Schmuziger N, Gurtler N (2010) Molecular analysis of aquaporin genes 1 to 4 in patients with Meniere's disease. *Cell Physiol Biochem* 26:787–792. doi:10.1159/000322346
- Choi YJ, Shin HS, Kim NN, Cho SH, Yamamoto Y, Ueda H, Lee J, Choi CY (2013) Expression of aquaporin-3 and -8 mRNAs in the parr and smolt stages of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*: effects of cortisol treatment and seawater acclimation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 165:228–236. doi:10.1016/j.cbpa.2013.03.013
- de Seigneux S, Nielsen J, Olesen ET, Dimke H, Kwon TH, Frokiaer J, Nielsen S (2007) Long-term aldosterone treatment induces decreased apical but increased basolateral expression of AQP2 in CCD of rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F87–F99. doi:10.1152/ajprenal.00431.2006
- Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S, Knepper MA (1995) Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol* 269:F663–F672
- Eckhard A, Gleiser C, Arnold H, Rask-Andersen H, Kumagami H, Muller M, Hirt B, Lowenheim H (2012) Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. *Mol Aspects Med* 33:612–637. doi:10.1016/j.mam.2012.06.004

13. Frigeri A, Gropper MA, Turck CW, Verkman AS (1995) Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4328–4331
14. Fukushima M, Kitahara T, Fuse Y, Uno Y, Doi K, Kubo T (2004) Changes in aquaporin expression in the inner ear of the rat after i.p. injection of steroids. *Acta Otolaryngol Suppl*:13-8 DOI [10.1080/03655230410017599](https://doi.org/10.1080/03655230410017599)
15. Hallpike CS, Cairns H (1938) Observations on the pathology of Meniere's syndrome: (section of otology). *Proc R Soc Med* 31: 1317–1336
16. Huang D, Chen P, Chen S, Nagura M, Lim DJ, Lin X (2002) Expression patterns of aquaporins in the inner ear: evidence for concerted actions of multiple types of aquaporins to facilitate water transport in the cochlea. *Hear Res* 165:85–95
17. Kitahara T, Fukushima M, Uno Y, Mishiro Y, Kubo T (2003) Up-regulation of cochlear aquaporin-3 mRNA expression after intra-endolymphatic sac application of dexamethasone. *Neurol Res* 25: 865–870. doi:[10.1179/016164103771953989](https://doi.org/10.1179/016164103771953989)
18. Kwon TH, Nielsen J, Masilamani S, Hager H, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S (2002) Regulation of collecting duct AQP3 expression: response to mineralocorticoid. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1403–F1421. doi:[10.1152/ajprenal.00059.2002](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00059.2002)
19. Lopez IA, Ishiyama G, Lee M, Baloh RW, Ishiyama A (2007) Immunohistochemical localization of aquaporins in the human inner ear. *Cell Tissue Res* 328:453–460. doi:[10.1007/s00441-007-0380-z](https://doi.org/10.1007/s00441-007-0380-z)
20. Manenschijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF (2009) Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 1179:179–198. doi:[10.1111/j.1749-6632.2009.05013.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05013.x)
21. Marlari S, Amspang EC, Koffman JS, Locke EM, Christensen BM, Nejsum LN (2014) Elevated cAMP increases aquaporin-3 plasma membrane diffusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 306:C598–C606. doi:[10.1152/ajpcell.00132.2013](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00132.2013)
22. Menière P (1861) Memoire sur les Itsions de l'oreille interne donnant lieu à des symptômes de congestion cérébrale apoplectiforme. *Gaz Med Paris* 16:597–601
23. Nevoux J, Teixeira M, Viengchareun S, Cosson C, Butlen D, Lombes M, Ferrary E (2011) Vasopressin, ATP and catecholamines differentially control potassium secretion in inner ear cell line. *FEBS Lett* 585:2703–2708. doi:[10.1016/j.febslet.2011.07.025](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.025)
24. Nielsen S, King LS, Christensen BM, Agre P (1997) Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* 273:C1549–C1561
25. Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 82:205–244. doi:[10.1152/physrev.00024.2001](https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2001)
26. Padoan S (2003) Oral versus i.v. administration of the glycerol test: side-effects and usefulness. *Acta Otolaryngol* 123:482–487. doi:[10.1080/0036554021000028088](https://doi.org/10.1080/0036554021000028088)
27. Phillips JS, Westerberg B (2011) Intratympanic steroids for Meniere's disease or syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*:CD008514 doi [10.1002/14651858.CD008514.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD008514.pub2)
28. Roudier N, Ripoche P, Gane P, Le Pennec PY, Daniels G, Cartron JP, Bailly P (2002) AQP3 deficiency in humans and the molecular basis of a novel blood group system, GIL. *J Biol Chem* 277:45854–45859. doi:[10.1074/jbc.M208999200](https://doi.org/10.1074/jbc.M208999200)
29. Rubenwolf PC, Georgopoulos NT, Kirkwood LA, Baker SC, Southgate J (2012) Aquaporin expression contributes to human transurothelial permeability in vitro and is modulated by NaCl. *PLoS One* 7:e45339. doi:[10.1371/journal.pone.0045339](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045339)
30. Sajjadi H, Paparella MM (2008) Meniere's disease. *Lancet* 372:406–414. doi:[10.1016/S0140-6736\(08\)61161-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61161-7)
31. Schenk LK, Bolger SJ, Luginbuhl K, Gonzales PA, Rinschen MM, Yu MJ, Hoffert JD, Pisitkun T, Knepper MA (2012) Quantitative proteomics identifies vasopressin-responsive nuclear proteins in collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* 23:1008–1018. doi:[10.1681/ASN.2011070738](https://doi.org/10.1681/ASN.2011070738)
32. Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, Zotta E, Bigi F, Berkowski D, Ibarra C (1999) Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon. *Braz J Med Biol Res* 32:1303–1313
33. Sterkers O, Saumon G, Tran Ba Huy P, Amiel C (1982) K, Cl, and H₂O entry in endolymph, perilymph, and cerebrospinal fluid of the rat. *Am J Physiol* 243:F173–F180
34. Sterkers O, Ferrary E, Amiel C (1984) Inter- and intracompartmental osmotic gradients within the rat cochlea. *Am J Physiol* 247: F602–F606
35. Sziklai I, Ferrary E, Horner KC, Sterkers O, Amiel C (1992) Time-related alteration of endolymph composition in an experimental model of endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* 102:431–438. doi:[10.1288/00005537-199204000-00011](https://doi.org/10.1288/00005537-199204000-00011)
36. Takeda T, Taguchi D (2009) Aquaporins as potential drug targets for Meniere's disease and its related diseases. *Handb Exp Pharmacol*: 171-84 DOI [10.1007/978-3-540-79885-9_8](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_8)
37. Tanaka M, Inase N, Fushimi K, Ishibashi K, Ichioka M, Sasaki S, Marumo F (1997) Induction of aquaporin 3 by corticosteroid in a human airway epithelial cell line. *Am J Physiol* 273: L1090–L1095
38. Teixeira M, Viengchareun S, Butlen D, Ferreira C, Cluzeaud F, Blot-Chabaud M, Lombes M, Ferrary E (2006) Functional IsK/KvLQT1 potassium channel in a new corticosteroid-sensitive cell line derived from the inner ear. *J Biol Chem* 281:10496–10507. doi:[10.1074/jbc.M512254200](https://doi.org/10.1074/jbc.M512254200)
39. Tipsmark CK, Sorensen KJ, Madsen SS (2010) Aquaporin expression dynamics in osmoregulatory tissues of Atlantic salmon during smoltification and seawater acclimation. *J Exp Biol* 213:368–379. doi:[10.1242/jeb.034785](https://doi.org/10.1242/jeb.034785)
40. Verkman AS (2013) Aquaporins. *Curr Biol* 23:R52–R55. doi:[10.1016/j.cub.2012.11.025](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.025)
41. Viengchareun S, Kamenicky P, Teixeira M, Butlen D, Meduri G, Blanchard-Gutton N, Kurschat C, Lanel A, Martinerie L, Sztal-Mazer S, Blot-Chabaud M, Ferrary E, Cherradi N, Lombes M (2009) Osmotic stress regulates mineralocorticoid receptor expression in a novel aldosterone-sensitive cortical collecting duct cell line. *Mol Endocrinol* 23:1948–1962. doi:[10.1210/me.2009-0095](https://doi.org/10.1210/me.2009-0095)
42. Watanabe S, Kaneko T, Aida K (2005) Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater. *J Exp Biol* 208:2673–2682. doi:[10.1242/jeb.01684](https://doi.org/10.1242/jeb.01684)
43. Zhang YW, Bi LT, Hou SP, Zhao XL, Song YL, Ma TH (2009) Reduced lung water transport rate associated with downregulation of aquaporin-1 and aquaporin-5 in aged mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:734–738. doi:[10.1111/j.1440-1681.2009.05156.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05156.x)

Article 4

Aldosterone-signaling defect exacerbates sodium wasting in very preterm neonates: The Premaldo Study

Laétitia Martinerie, Eric Pussard, Nadia Yousef, Claudine Cosson, Ingrid Lema,

Khaled Hussein, Sébastien Mur, Marc Lombès*, Pascal Boileau*

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015, 100, 4074. 4081.

Aldosterone-Signaling Defect Exacerbates Sodium Wasting in Very Preterm Neonates: The Premaldo Study

Laetitia Martinerie, Eric Pussard, Nadya Yousef, Claudine Cosson, Ingrid Lema, Khaled Hussein, Sébastien Mur, Marc Lombès,* and Pascal Boileau*

Inserm (L.M., E.P., I.L., M.L.), U1185, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; Service d'Endocrinologie Pédiatrique (L.M.), Hôpital Robert Debré, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, F-75019 Paris, France; PremUp Foundation (L.M., M.L., P.B.), F-75005 Paris, France; Université Paris Diderot (L.M.), Sorbonne Paris Cité, F-75019 Paris, France; Faculté de Médecine Paris-Sud (E.P., I.L., M.L.), UMR-S1185, Université Paris-Sud 11, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie (E.P., I.L.), Service de Réanimation Pédiatrique et Néonatale (N.Y.), and Service de Biochimie (C.C.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, F-94275, France; Service de Réanimation Néonatale (K.H.), CHRU, F-86000 Poitiers, France; Service de Réanimation Néonatale (S.M.), CHRU Lille Jeanne de Flandre, F-59037 Lille, France; Service d'Endocrinologie et Maladies de la Reproduction (M.L.), Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin Bicêtre, F-94275, France; Service de Réanimation Néonatale (P.B.), CH Poissy St-Germain-en-Laye, F-78303 Poissy, France; and EA 7285, UFR des Sciences de la Santé (P.B.), Simone Veil, Université Versailles St-Quentin en Yvelines, Montigny le Bretonneux F-78180, France

Context: The neonatal period, notably in preterm infants, is characterized by high sodium wasting, implying that aldosterone, the main hormone regulating sodium reabsorption, is unable to maintain sodium homeostasis.

Objective: This study sought to assess aldosterone secretion and action in neonates according to gestational age (GA).

Design and Setting: This was a multicenter prospective study (NCT01176162) conducted between 2011 and 2014 at five neonatology departments in France. Infants were followed during their first 3 months.

Participants: The 155 newborns included were classified into three groups: Group 1 (n = 46 patients), <33 gestational weeks (GW); Group 2 (n = 67 patients), 33–36 GW; and Group 3 (n = 42 patients), ≥37 GW.

Main Outcome Measures: Plasma aldosterone was measured in umbilical cord blood. Urinary aldosterone (UAldo) was assessed at day 0, day 3, month 1, and month 3 postnatal. The correlation between UAldo and the urinary Na/K ratio was determined as an index of renal aldosterone sensitivity.

Results: UAldo significantly increased with GA: from 8.8 ± 7.5 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ of creatinine (Group 1) to 21.1 ± 21.0 (Group 3) in correlation with plasma aldosterone levels in all groups ($P < .001$), demonstrating its reliability. The aldosterone/renin ratio significantly increased with GA, suggesting an aldosterone secretion defect in preterm infants. UAldo and urinary Na/K were correlated in very preterm but not in term neonates, consistent with very preterm neonates being renal-aldosterone sensitive and term neonates being aldosterone resistant.

Conclusions: Very preterm infants have a previously unrecognized defective aldosterone secretion but conserved renal aldosterone sensitivity in the neonatal period, which modifies the current view of sodium balance in these infants and suggests alternative management approaches. (*J Clin Endocrinol Metab* 100: 4074–4081, 2015)

At birth, the human kidney displays tubular immaturity, associating sodium wasting and an impaired ability to reabsorb water (1). These characteristics are exacerbated in premature infants (2). The inability to maintain homeostatic functions is a major problem for the 10% of neonates born preterm (3). Neonatologists have to find a balance between the life-threatening risk of dehydration and the morbidity associated with excessive sodium and water supplementation, such as bronchopulmonary dysplasia (4), patent ductus arteriosus, and necrotizing enterocolitis (5), which are the most common causes of morbidity and mortality in the most immature preterm children (6, 7). A better understanding of water and sodium regulation during the neonatal period is required for developing new therapeutic strategies for the management of very preterm infants.

Sodium homeostasis in humans is mainly controlled by the renin-angiotensin-aldosterone system. Aldosterone, a steroid hormone, is synthesized in the zona glomerulosa of the adrenal cortex. It regulates sodium reabsorption by activating the mineralocorticoid receptor (MR), a transcription factor (8). In the distal nephron, most MR-target genes are involved in sodium reabsorption and potassium excretion, including, for example, the genes encoding the Na-K-ATPase pump, or the alpha subunit of the epithelial sodium channel (8).

Preterm infants display both renal tubular immaturity and sodium wasting (1), and this suggests that the renin-angiotensin-aldosterone-MR pathway may not be fully functional. We previously demonstrated physiological and transient renal aldosterone resistance in term neonates (9): plasma aldosterone and renin concentrations in umbilical cord blood are high for term births, contrasting with functional signs of hypoaldosteronism (high serum potassium concentration, urinary sodium loss, and an urinary Na/K ratio >1). This aldosterone resistance or pseudohypoaldosteronism is associated with a weak or undetectable renal MR expression at birth (10).

However, it is not known whether this aldosterone-signaling defect is also present in preterm neonates and to what extent it contributes to the sodium wasting observed. To address this issue, we conducted a multicenter observational study involving preterm and term newborn infants with followup for their first 3 months of life. Our aims were, first, to assay aldosterone in the preterm and term infants and, second, to determine the progress of renal aldosterone resistance during the postnatal period, by correlating urinary aldosterone (UAldo) concentration as a noninvasive index of aldosterone levels, and markers of renal mineralocorticoid signaling.

Patients and Methods

Patients

We enrolled 155 neonates in five neonatology departments in France (Clamart, Poissy, Kremlin-Bicêtre, Poitiers, and Lille) into this multicenter observational study. Inclusion criteria were mothers age 18–45 years old, no diabetes mellitus type 1 or 2 prior to pregnancy, and none of the following maternal treatments prior to pregnancy: systemic or inhaled glucocorticoid therapy, hormonal treatment for adrenal or pituitary insufficiency, or antihypertensive drugs. Gestational age (GA) was determined by a first-trimester ultrasound scan. No infant had a congenital malformation at birth. Deliveries were either vaginal or by cesarean section. Prematurity was mainly spontaneous and it was either due to preterm labor or preterm premature rupture of membranes. Infants with a birth weight less than the 10th percentile for GA (11) were excluded. Corticosteroid therapy prior to birth or during hospitalization and major neonatal complications were recorded during followup.

Role of the funding source

Our study was funded by a grant from the French Ministry of Health and from Assistance Publique, Hôpitaux de Paris (Premaldo PHRC 2009 AOM 09175), Inserm and Université Paris-Sud and has been registered on ClinicalTrials.gov (NCT01176162). The funding source had no role in study design, collection, analysis, interpretation of data, nor in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication. Only the authors had access to the study data and were responsible for publication decisions.

Blood and urinary samples

Venous blood samples were collected from umbilical cords into EDTA and heparinized tubes and immediately transferred to the laboratory for centrifugation. Supernatants were stored at -20°C . Single-spot urinary samples were collected onto a gauze compress settled in the diaper during the first 24 hours of life (D0), on day 3 (D3), and after 1 month ($\text{M1} \pm 3 \text{ d}$) and 3 months ($\text{M3} \pm 1 \text{ wk}$). Compresses not contaminated by meconium or feces were stored at -20°C before subsequent processing. Ethical considerations prevented 24-hour urinary collection.

Hormonal and biochemical analyses

Plasma aldosterone and renin concentrations as well as electrolytes, proteins, and creatinine levels were measured in umbilical cord blood. Hemolyzed samples were excluded from the analysis. Aldosterone, electrolyte, and creatinine concentrations were determined in urine samples extracted from compresses. All measurements were made centrally in the Kremlin-Bicêtre department of hormonology and biochemistry and processed in the same parallel experiment, as previously described (9). Briefly, active renin and aldosterone plasma concentrations were assessed using the Renin III generation RIA kit and the Aldo-RIA CT kit, respectively (CIS-Bio International). UAldo was assayed after acid hydrolysis of aldosterone 18-glucuronide during for 18 hours at 30°C . For measurements on random urine samples, values of UAldo output were corrected for creatinine excretion. Electrolytes, Blood Urea Nitrogen (BUN), total proteins, and creatinine were measured with the automat Modular P (Roche). Sodium waste was determined as the fractional excretion of sodium

(FeNa) calculated with the following equation: (plasma creatinine \times urinary sodium)/(plasma sodium \times urinary creatinine) % at D0 and as the urinary Na/creatinine and Na/K ratios at all postnatal stages.

Statistics

Clinical and biological characteristics at birth, urinary electrolyte concentrations, and aldosterone excretion values are expressed as means \pm SD with the range as well as median and interquartiles. Analyses of variance were performed to compare the mean urinary electrolyte or aldosterone excretion values between the three groups. Nonparametric methods were used: Kruskal-Wallis tests for global comparison between the three groups followed by a Mann-Whitney *U* test with a Bonferroni's correction for pairwise comparisons. Correlations between two parameters or comparisons between values of the same parameter at two different times were studied by calculating Spearman correlation coefficients and using Wilcoxon signed-ranks test, respectively. A two-sided *P* < .05 was considered to indicate statistical significance. We computed a receiver-operating characteristic (ROC) curve using DeLong's method. Regression estimates from this model defined a diagnostic signature, and the area under the curve, sensitivity, and specificity were used to evaluate this signature.

All statistical analyses were performed using SAS software version 9.3 (SAS Institute) for correlations, and the GraphPad

Prism software version 6 (GraphPad software, Inc.) for ROC curves.

Study approval

Informed and written consent was obtained from both parents prior to inclusion in the study. The study was approved by the National Data Protection Authority and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and after approval of the relevant ethical committee (CPP, Comité de Protection des Personnes, Ile de France).

Results

Clinical and biological characteristics of the newborn infants

The 155 newborn infants included were classified into three groups according to their GA at birth: Group 1 (very preterm), less than 33 GW; Group 2 (moderate to late preterm), 33–36 GW; and Group 3 (term), at least 37 GW. Selected clinical, biochemical, and hormonal characteristics of the patients are shown in Table 1.

Table 1. Clinical, Biochemical, and Hormonal Characteristics of the Patients at Birth (D0)

Characteristic	Group 1 (<33 GW)			Group 2 (33–36 GW)			Group 3 (\geq 37 GW)		
	Mean \pm SD	Range	Median (IQR)	Mean \pm SD	Range	Median (IQR)	Mean \pm SD	Range	Median (IQR)
Clinical data									
Subjects, n	46			67			42		
Sex ratio, M/F	24/22			32/35			25/17		
Mean GA, wk	30.4 \pm 1.5 ^{a,b}	26–32		34.0 \pm 1.0 ^c	33–36		39.3 \pm 1.3	37–41	
BW at birth, g	1546 \pm 325 ^{a,b}	895–2240		2120 \pm 357 ^c	1360–3150		3309 \pm 402	2550–4030	
Cord blood plasma									
Na, mmol/L	137 \pm 3.3	129–145	137 (135–139)	138 \pm 4.2	118–146	138 (136–140)	139 \pm 2.3	132–143	139 (137–140)
K, mmol/L	6.6 \pm 2.4 ^c	3.6–13.6	5.8 (4.7–8.2)	5.9 \pm 1.6	3.8–12.5	5.6 (4.6–6.7)	6.2 \pm 2.3	4.2–12.1	5.0 (4.6–7.3)
Protein, g/L	44 \pm 5 ^a	33–57	45 (40–48)	48 \pm 4 ^f	35–62	47 (44–51)	59 \pm 6	47–74	58 (56–62)
Creatinine, μ mol/L	39.9 \pm 19.7 ^{c,d}	18–107	37 (30–43)	53.5 \pm 18.3	18–95	52 (42–61)	51.8 \pm 15.4	18–100	51 (42–59)
Aldosterone, ng/dL	36.8 \pm 35.0 ^{a,b}	3.0–136.6	23.5 (14.6–48.4)	58.5 \pm 39.4 ^e	3.7–187.2	51.9 (32.1–80.3)	103.8 \pm 65.4	15.7–272.2	91.1 (48.6–143.7)
Renin, ng/dL	13.2 \pm 14.2	0.8–68.3	8.0 (4.4–15.8)	8.9 \pm 8.7	0.3–44.7	6.7 (2.7–10.1)	8.3 \pm 6.7	1.2–36.6	5.9 (4.2–10.1)
Aldosterone/renin ratio	5.0 \pm 5.9 ^{a,b}	0.4–33.1	2.9 (1.4–6.8)	18.7 \pm 40.6	0.5–284.0	7.4 (3.6–17.7)	22.9 \pm 34.1	1.1–199.3	12.1 (7.0–28.8)
Urine at D0									
Na/creatinine, mmol/mmol	69.8 \pm 45.9 ^{a,d}	15.8–180.0	54.0 (34.1–107.4)	47.3 \pm 50.9 ^e	4.5–333.3	34.0 (18.7–56.2)	10.0 \pm 8.4	0.8–33.1	7.2 (3.3–13.5)
K/creatinine, mmol/mmol	20.2 \pm 8.5 ^{a,d}	2.0–46.4	22.0 (14.8–25.1)	16.1 \pm 7.1 ^e	4.8–35.6	14.9 (9.3–22.2)	7.5 \pm 3.8	1.9–19.3	7.4 (4.3–9.0)
Urinary Na/K	4.4 \pm 4.3 ^a	0.8–21.5	2.8 (1.8–6.1)	3.2 \pm 3.1 ^e	0.4–15.0	2.0 (1.2–3.6)	1.3 \pm 0.9	0.3–4.4	1.1 (0.7–1.5)
FeNa, %	1.90 \pm 1.51 ^a	0.4–6.7	1.3 (0.8–2.6)	1.88 \pm 1.78 ^e	0.2–8.0	1.3 (0.7–2.5)	0.37 \pm 0.35	0.0–1.4	0.3 (0.1–0.5)
Aldosterone/creatinine, μ g/mmol	8.8 \pm 7.4 ^a	0.7–27.4	6.8 (2.8–11.8)	10.6 \pm 9.2 ^c	0.6–48.8	7.9 (5.6–12.9)	21.1 \pm 21.0	2.2–100.0	17.21 (8.8–25.2)

Abbreviation: BW, birth weight.

Patients were classified into three groups according to GA at birth (groups 1, 2, and 3).

Kruskal-Wallis tests followed by Mann-Whitney *U* tests with Bonferroni's correction for pairwise comparisons were used for overall comparisons between the three groups. Statistical differences are expressed as follows:

^a *P* < .001 between Group 1 and Group 3.

^b *P* < .001 between Group 1 and Group 2.

^c *P* < .01 between Group 1 and Group 3.

^d *P* < .01 between Group 1 and Group 2.

^e *P* < .001 between Group 2 and Group 3.

^f *P* < .01 between Group 2 and Group 3.

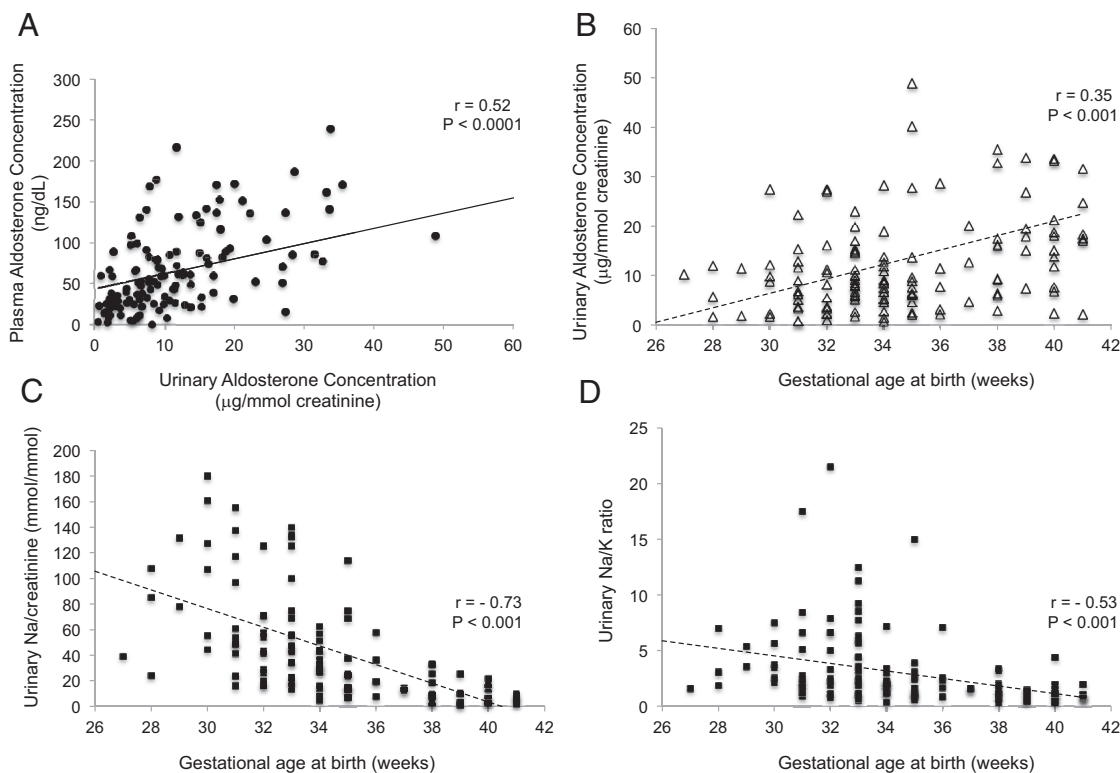


Figure 1. UAldo is a reliable index of aldosterone secretion in neonates and its correlation with gestational age is in the opposite direction of those of sodium-wasting and urinary Na/K ratio at birth. A, Plasma aldosterone concentration as a function of UAldo concentration. Each dot represents one patient. B, UAldo concentration (Δ) as a function of GA. Each Δ represents one patient. C, Urinary sodium excretion (urinary Na/creatinine) (\blacksquare) as a function of GA. Each \blacksquare represents one patient. D, Urinary Na/K ratio (\blacksquare) as a function of GA. Each \blacksquare represents one patient. For presentation purposes, the two highest values do not appear on the graphs. Linear regression lines are presented with Spearman's correlation coefficient (r) and its statistical significance (P values). Similar results were obtained when the two highest values in Group 3 (term neonates) were excluded from the analysis. The observed differences remained significant.

Mean serum potassium concentration (>5.5 mmol/L) at birth was high in all groups, whereas serum sodium concentration was within the normal range, consistent with biological signs of functional hypoaldosteronism (aldosterone insufficiency and/or resistance) at birth in all newborn infants.

Plasma aldosterone concentrations at birth (mean \pm SD) increased significantly with GA (36.8 ± 35.0 ng/dL or 102.1 ± 97.0 pmol/L in Group 1; 58.5 ± 39.4 ng/dL or 162.3 ± 109.1 pmol/L in Group 2; and 103.8 ± 65.4 ng/dL or 287.9 ± 181.2 pmol/L in Group 3; see Table 1). Plasma aldosterone/renin ratio (mean \pm SD) was significantly lower in Group 1 (5.0 ± 5.9) than in Group 2 (18.7 ± 4.1) and Group 3 (22.9 ± 34.1), highly suggestive of inappropriate aldosterone secretion at birth in very preterm infants.

Urinary electrolytes and aldosterone excretion

Our simple and noninvasive method of urine collection—a single urine sample obtained during the first hours of life—facilitated measurements of the excretion of both urinary electrolytes and aldosterone. UAldo concentrations (Table 1 and Supplemental Figure 1) were signifi-

cantly lower in Group 1 than in Groups 2 and 3 (8.8 ± 7.5 , 10.6 ± 9.2 , and 21.1 ± 21.0 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ of creatinine, in Groups 1, 2, and 3, respectively; $P < .001$). UAldo was positively and significantly correlated with plasma aldosterone concentration at birth in the entire cohort (Figure 1A; $P < .001$), and was therefore a reliable index of aldosterone secretion by neonates. Sodium wasting was assessed as the urinary Na/creatinine ratio (69.8 ± 45.9 , 47.3 ± 50.9 , and 10.0 ± 8.4 mmol/mmol of creatinine, in Groups 1, 2, and 3, respectively; $P < .001$; Table 1); as expected, it was significantly higher in preterm than in term infants. Both UAldo concentrations (Figure 1B) and sodium wasting at birth correlated with GA but in opposite directions (Figure 1, C and D), suggesting an association between defective mineralocorticoid signaling and sodium wasting at birth in all newborn infants. Similarly, UAldo concentration correlated positively and FeNa negatively with GA ($P < .001$; Supplemental Figure 2), further supporting this possibility.

Evolution of UAldo concentrations over time

UAldo concentrations were studied over time in the three groups (Figure 2, Supplemental Table 1). UAldo con-

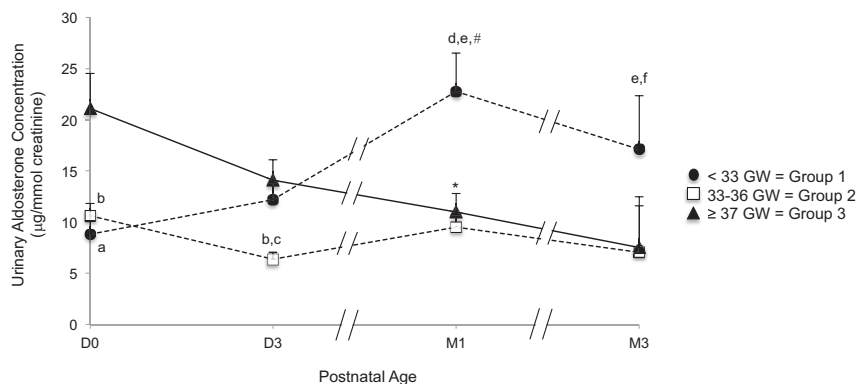


Figure 2. The changes in UAldo concentration during the first months of life depend on gestational age at birth. Each ●/□/▲ represents the mean ± SEM of UAldo (UAldo) concentrations for a gestational age group at a particular time point. Statistical differences are illustrated as follows: A, $P < .001$ between Group 1 and Group 3; B, $P < .001$ between Group 2 and Group 3; C, $P < .01$ between Group 1 and Group 2; D, $P < .001$ between Group 1 and Group 2; E, $P < .05$ between Group 1 and Group 3; F, $P < .05$ between Group 1 and Group 2. #, $P < .001$; and *, $P < .05$ between mean values at D0 and M1 within one group; Kruskal-Wallis tests followed by Mann-Whitney U tests with Bonferroni’s correction for pairwise comparisons were used for overall comparisons between the three groups. Wilcoxon signed-rank test was used for comparisons between values of the same variable at two different time points.

centrations progressively declined from $21.1 \pm 21.0 \mu\text{g}/\text{mmol}$ at D0 to $7.5 \pm 5.0 \mu\text{g}/\text{mmol}$ at M3 in Group 3; in Group 2, UAldo concentrations remained stable until M1 ($\sim 10 \mu\text{g}/\text{mmol}$), and thereafter decreased at the same rate as Group 3, and with superimposable values. In sharp contrast, UAldo concentrations in Group 1 increased during the first postnatal month, reaching a peak at M1 ($22.8 \pm 13.1 \mu\text{g}/\text{mmol}$) significantly higher than the

values for the other groups at the same time point ($P < .001$), yet similar to the UAldo concentration values for Group 3 at D0. Thereafter, UAldo concentrations declined, paralleling the decrease of UAldo concentrations for the other groups.

Evolution of aldosterone sensitivity

Renal aldosterone responsiveness was assessed in the three groups at birth (D0) and at M1 by measuring the correlation between UAldo concentrations and the urinary Na/K ratio, as the former directly regulates the latter (12) (Figure 3A).

At birth, there was no detectable correlation between UAldo concentrations and urinary Na/K ratio in term neonates (Group 3: $r = -0.19$; $P = .26$), indicating renal resistance to aldosterone action. Such renal aldosterone resistance was also observed in the moderate and late preterm neonates (Group 2: $r = -0.20$; $P = .13$). However, very preterm neonates (Group 1) were significantly sensitive to aldosterone ($r = -0.57$ for the relationship between UAldo and urinary Na/K; $P < .001$). Between D0 and M1, very preterm infants became resistant to aldo-

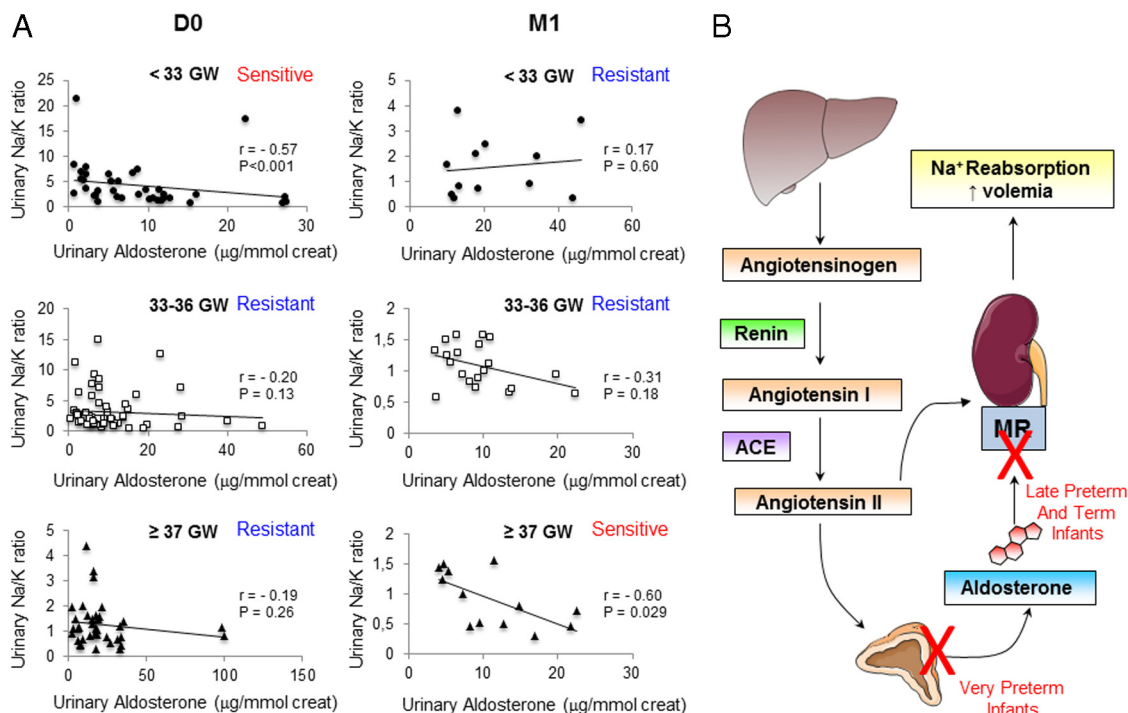


Figure 3. Variation in aldosterone sensitivity with GA and postnatal development. A, Correlation between UAldo concentration and the urinary Na/K ratio at D0 and at M1. Each ●/□/▲ represents one value. Linear regression lines are presented for the readability of the figure, accompanied by Spearman’s correlation coefficient (r) and its statistical significance (P values). B, Scheme showing the two levels of mineralocorticoid signaling defects at birth in very preterm or in moderate preterm and term infants.

sterone ($r = 0.17$; $P = .60$), other preterm infants remained resistant to aldosterone ($r = -0.31$; $P = .18$), and term infants developed renal sensitivity to aldosterone ($r = -0.60$; $P = .029$).

Ratio between UAldo concentration and urinary Na excretion as a predictive marker to discriminate between aldosterone sensitivity and resistance

To assess its value as an index for predicting renal mineralocorticoid sensitivity, the UAldo concentration/urinary Na excretion ratio at birth was compared between the two most functionally divergent groups as described above, ie, Group 1 (sensitive to aldosterone action) and Group 3 (resistant to aldosterone action). The ROC curve obtained had an area under curve of 0.95 ± 0.02 , 95% confidence interval (CI), 0.91–0.99; $P < .0001$ (Figure 4A). With the use of a cutoff value of 0.51 for the diagnostic signature, renal aldosterone sensitivity was predicted with a specificity of 86.8%; 95% CI, 74.6–97.0; and a sensitivity of 89.2%; 95% CI, 71.9–95.6 (Figure 4B). This index may therefore be a useful tool to distinguish between neonates sensitive to aldosterone action and those who are resistant. Hence, newborn infants with a UAldo concentration/urinary Na excretion ratio below 0.51 could be considered to be aldosterone sensitive, despite aldosterone secretion deficiency.

Discussion

This multicenter observational study of preterm and term infants has several major consequences. It demonstrates that UAldo concentrations measured from a single urinary spot can reliably evaluate aldosterone secretion in neo-

nates. Indeed, UAldo concentrations correlated strongly with plasma aldosterone concentrations at birth. This method is noninvasive and reproducible, and could thus become a useful tool in preterm infants.

We measured aldosterone secretion at birth, and found that very preterm infants have a defective aldosterone biosynthesis or secretory pathway, which is not the case for term infants (Figure 3B). This aldosterone secretion deficiency may account for their high sodium wasting during the neonatal period and may reflect the immaturity of the adrenal cortex. During development, the fetal adrenal cortex is mainly composed of the fetal zone, which synthesizes and secretes androgens, most notably dehydroepiandrosterone sulfate (13). Plasma cortisol concentrations at birth are low in very preterm infants (14). After 30 GW, the fetal adrenal cortex resembles a rudimentary form of the adult adrenal cortex and becomes able to synthesize cortisol (15) and, our study suggests, aldosterone. In human and sheep, angiotensin II receptors are abundantly expressed in the zona glomerulosa of the fetal adrenal gland after 16 GW, such that it is unlikely to be involved in the aldosterone secretion defect observed (16, 17). It has been suggested that the fetal adrenal cortex contains an immature set of enzymes; in particular low 11β -hydroxylase activity (CYP11B1), responsible for elevated 17-hydroxyprogesterone levels (18) (leading in preterm infants to frequent false-positive screening results for congenital adrenal hyperplasia) (19) as well as, in a similar manner, conceivable low CYP11B2 activity, may be responsible for low aldosterone and cortisol biosynthesis in very preterm infants (14).

A major difference between the very preterm and term infants in our study, was antenatal corticosteroid admin-

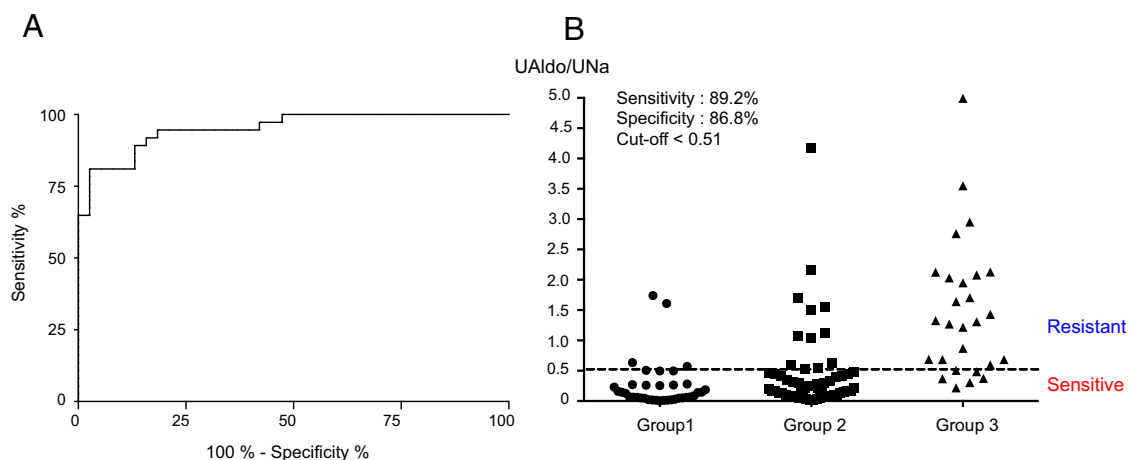


Figure 4. Index of aldosterone sensitivity. A, receiver operating characteristic curve comparing the UAldo concentration/urinary Na excretion ratio between aldosterone-sensitive (Group 1) and aldosterone-resistant (Group 3) infants at birth. Regression estimates from this model defined a diagnostic signature, and we used the under the curve, sensitivity, and specificity to evaluate the ability of this signature to discriminate between aldosterone sensitivity and resistance. B, Panel showing the cutoff value (dotted line) with the highest accuracy for all newborns (groups 1, 2, and 3).

istration (betamethasone) for prevention of neonatal respiratory distress syndrome (20). However, no difference in UAldo concentrations was observed between neonates from Group 2 who did ($n = 49$) and did not ($n = 12$; $P = .36$) receive antenatal betamethasone. Thus, it is highly unlikely that antenatal corticosteroid administration was responsible for the low aldosterone levels observed in preterm infants. This view is also supported by a previous and similar observation on aldosterone cord levels (21).

This work confirms our previous findings of a physiological partial aldosterone resistance in term neonates, with high levels of aldosterone and renin that contrast with functional signs of hypoaldosteronism (9). This hormonal unresponsiveness is linked to the weak expression of renal MRs at birth (10). We confirm this hormonal resistance at birth in term infants with high levels of aldosterone and unresponsive kidneys, as indicated by the lack of correlation between UAldo concentrations and the Na/K urinary ratio. On the contrary, despite low aldosterone levels, we found that very preterm infants were sensitive to aldosterone: UAldo concentrations correlated with the Na/K ratio at birth. This sensitivity was transient and very preterm infants became resistant to aldosterone during the first month of life. Most likely these observations are the result of the transient renal MR expression observed during fetal development (10). It is also likely that individual polymorphisms in genes of the mineralocorticoid signaling pathway might be involved in the biological variability observed in the results in each Group of neonates that will need to be further investigated.

One limitation of our study, particularly for changes in UAldo concentrations with age, is the number of data points and urinary samples missing from M1 and thereafter; this is a consequence of the transfer of many preterm infants from a Neonatal Intensive Care Unit to other pediatric centers within a few weeks of birth, and the difficulties of urine collection in an outpatient clinic setting. Despite this limitation, we were able to describe different evolutionary patterns of UAldo concentrations during the first months of life, depending on GA at birth. There was a postnatal surge in aldosterone secretion in very preterm infants, with UAldo concentrations at M1 reaching those of term infants at birth. This postnatal surge is probably due to both adrenal maturation and renal MR down regulation (10). Thereafter, UAldo concentrations decreased similarly to those of term infants, but with a noticeable delay. This abnormal progress of the UAldo concentration profile with age, most notably the low neonatal UAldo concentrations and the postnatal surge in very preterm infants, may play an important role in the pathogenesis of some of the adverse postnatal outcomes observed in this population. Primarily, it affects sodium reabsorption with

high sodium loss in very preterm infants requiring sodium supplementation to maintain sodium and water homeostasis (22, 23). Secondly, it may contribute to the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia (23, 24). However, further investigation is required to explore this issue.

Finally, we show that the UAldo concentration/Na excretion ratio is a potential predictive index of renal sensitivity to aldosterone action. This index could serve as a useful, sensitive, and selective measure to distinguish between aldosterone-sensitive and aldosterone-resistant preterm infants and identify those, particularly in the moderate preterm group (Figure 4B), who may benefit from aldosterone supplementation. This marker should be validated in further prospective studies.

In conclusion, our results demonstrate defective aldosterone secretion but conserved renal aldosterone sensitivity during the first days of life of very preterm infants. These findings mean that the current view of water and electrolyte balance in preterm neonates needs to be reevaluated, and suggest an alternative management approach for the very preterm infants.

Acknowledgments

We thank Armelle Arnoux for statistical analyses (Unité de Recherche Clinique, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin Bicêtre, France). We also thank Dr Rakza (CHU Jeanne de Flandre, Lille, France), Dr Mokhtari and Dr Boithias (CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France) for patient inclusions. We are indebted to Prof Jean-Claude Carel (Service d'Endocrinologie Pédiatrique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debre, Paris, France) for his valuable comments and discussions on the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr Marc Lombes, MD, PhD, Inserm U1185, Faculté de Médecine Paris-Sud, 63, Rue Gabriel Péri, F-94276 Le Kremlin Bicêtre Cedex France. E-mail: marc.lombes@u-psud.fr. Prof Pascal Boileau, MD, PhD, Service de Réanimation Néonatale, Hôpital de Poissy, F-78303 Poissy, France. E-mail: p.boileau@chi-poissy-st-germain.fr.

Author Contributions: L.M., E.P., N.Y., C.C., I.L., K.H., S.M., M.L., and P.B. contributed to the analysis and interpretation of data and drafting of the manuscript. L.M., E.P., N.Y., C.C., I.L., K.H., S.M., M.L., and P.B. had complete access to the data, revised the manuscript critically for important intellectual content; read and approved the final version submitted for publication; and shared responsibility for the decision to submit for publication. L.M., M.L., and P.B. contributed to the study concept and design. E.P., N.Y., C.C., I.L., K.H., S.M., and P.B. were responsible for data acquisition. L.M., M.L., and P.B. were responsible for study supervision and statistical analyses.

The Premaldo Study was registered in ClinicalTrials.gov as trial number NCT01176162.

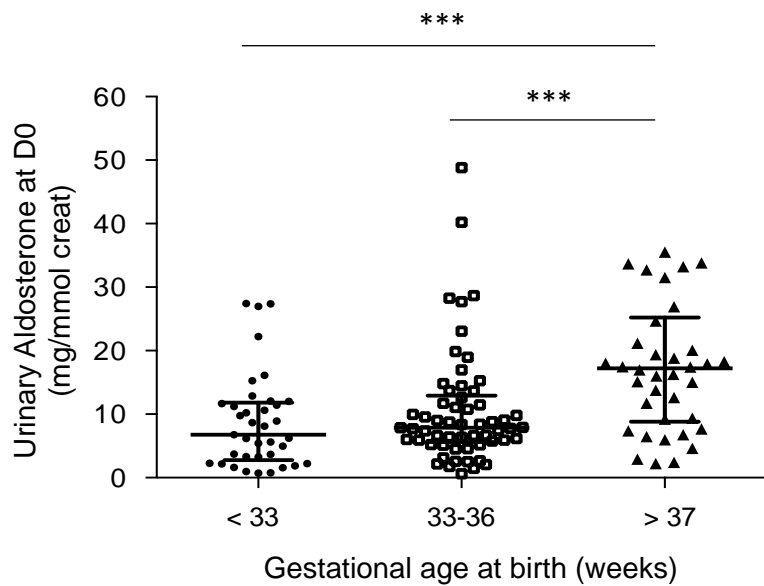
This work was supported by a grant from the French Ministry of Health and from Assistance Publique, Hôpitaux de Paris (Pre-

maldo PHRC 2009 AOM 09175), Inserm and Université Paris–Sud. L.M. was supported in part by a PremUp postdoctoral fellowship. I.L. is the recipient of a Cardiovasculaire-Obésité-Rein-Diabète-Domaine d'Intérêt Majeur (CORDDIM) fellowship (Région Ile de France).

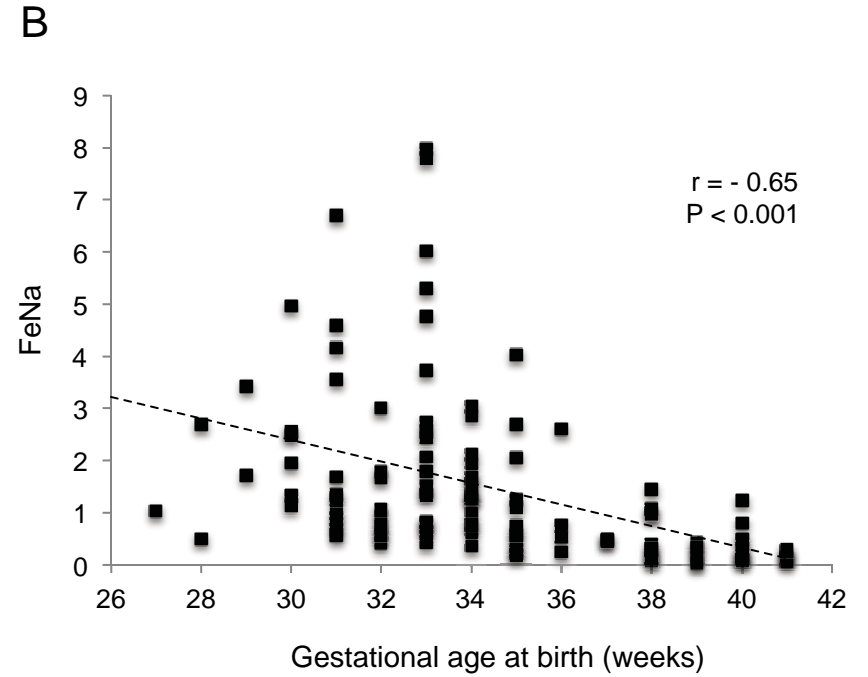
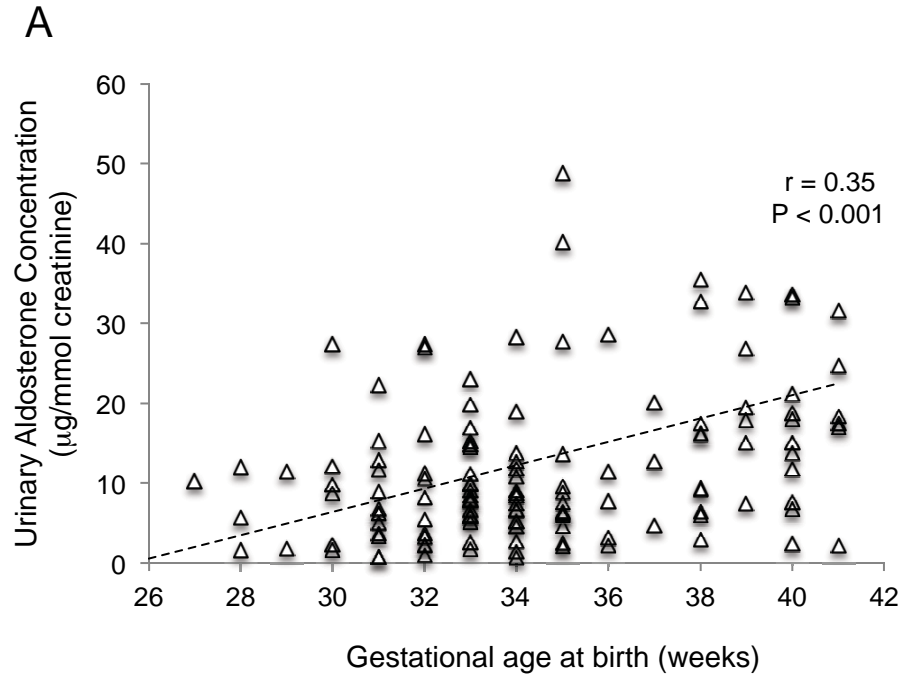
Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Holtbäck U, Aperia AC. Molecular determinants of sodium and water balance during early human development. *Semin Neonatol*. 2003;8:291–299.
- Sulyok E, Varga F, Györy E, Jobst K, Csaba IF. Postnatal development of renal sodium handling in premature infants. *J Pediatr*. 1979; 95:787–792.
- Barros FC, Papageorgiou AT, Victora CG, et al. The distribution of clinical phenotypes of preterm birth syndrome: Implications for prevention. *JAMA Pediatr*. 2015;169:220–229.
- Oh W, Poindexter BB, Perritt R, et al. Association between fluid intake and weight loss during the first ten days of life and risk of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants. *J Pediatr*. 2005;147:786–790.
- Bell EF, Acarregui MJ. Restricted versus liberal water intake for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;12:CD000503.
- Ancel PY, Goffinet F, EPIPAGE-2 Writing Group. Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: Results of the EPIPAGE-2 cohort study. *JAMA Pediatr*. 2015;169:230–238.
- Patel RM, Kandeler S, Walsh MC, et al. Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011. *N Engl J Med*. 2015;372:331–340.
- Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, et al. The mineralocorticoid receptor: Insights in its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal*. 2007;5:e012.
- Martinerie L, Pussard E, Foix- L'Hélias L, et al. Physiological partial aldosterone resistance in human newborns. *Pediatr Res*. 2009;66: 323–328.
- Martinerie L, Viengchareun S, Delezoide AL, et al. Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology*. 2009;150: 4414–4424.
- Mamelle N, Munoz F, Grandjean H. [Fetal growth from the AUDIPOG study. I. Establishment of reference curves]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1996;25:61–70.
- Eudy RJ, Sahasrabudhe V, Sweeney K, et al. The use of plasma aldosterone and urinary sodium to potassium ratio as translatable quantitative biomarkers of mineralocorticoid receptor antagonism. *J Transl Med*. 2011;9:180.
- Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*. 1997;18:378–403.
- Hingre RV, Gross SJ, Hingre KS, Mayes DM, Richman RA. Adrenal steroidogenesis in very low birth weight preterm infants. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78:266–270.
- Sucheston ME, Cannon MS. Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J Morphol*. 1968;126:477–491.
- Coulter CL, Myers DA, Nathanielsz PW, Bird IM. Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor and cytochrome P450(c11) in the sheep adrenal gland. *Biol Reprod*. 2000;62:714–719.
- Breault L, Lehoux JG, Gallo-Payet N. The angiotensin AT2 receptor is present in the human fetal adrenal gland throughout the second trimester of gestation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:3914–3922.
- Kamrath C, Hartmann MF, Boettcher C, Wudy SA. Reduced activity of 11 β -hydroxylase accounts for elevated 17 α -hydroxyprogesterone in preterms. *J Pediatr*. 2014;165:280–284.
- Coulim B, Coste J, Tardy V, et al. Efficiency of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in children born in mainland France between 1996 and 2003. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012;166:113–120.
- Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006:CD004454.
- Procianoy RS, de Oliveira-Filho EA. Aldosterone cord levels in preterm newborn infants. *Acta Paediatr*. 1996;85:611–613.
- Hartnoll G, Bétrémieux P, Modi N. Randomised controlled trial of postnatal sodium supplementation on body composition in 25 to 30 week gestational age infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2000;82:F24–F28.
- Brem AS. Electrolyte disorders associated with respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia. *Clin Perinatol*. 1992; 19:223–232.
- Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*. 2006;367:1421–1431.



Supplemental Figure S1



Supplemental Figure S2

Titre : Contrôle Post-Transcriptionnel de l'Expression rénale du Récepteur Minéralocorticoïde par les Variations de Tonicité Extracellulaire : Conséquences Physiopathologiques

Mots clés : Récepteur Minéralocorticoïde, Aldostérone, Tonicité extracellulaire, Protéine de liaison à l'ARN, microARN, Epissage alternatif.

Résumé : L'aldostérone et le Récepteur Minéralocorticoïde (MR) participent au contrôle de la balance hydrosodée et de la pression artérielle. Les altérations de l'expression du MR ou de la signalisation minéralocorticoïde sont associées à de nombreuses pathologies chez l'Homme. Dans ce travail, nous avons démontré, le rôle majeur de protéines de liaison à l'ARN, Tis11b et HuR, dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression du MR en réponse aux variations de tonicité extracellulaire dans un modèle de cellules principales rénales et chez la souris. L'hypertonie (500 mOsmol/L) induit l'expression de la protéine Tis11b, qui lie la région 3' non traduite du transcrite MR afin d'accélérer sa dégradation, diminuant ainsi l'expression rénale de la protéine MR et de la signalisation minéralocorticoïde.

A l'opposé, l'hypotonie (150 mOsmol/L) stimule la translocation nucléo-cytoplasmique de HuR, qui stabilise le transcrite MR, augmentant ainsi l'expression du MR et la sensibilité rénale à l'aldostérone. De plus, HuR est responsable de l'édition d'un nouveau variant d'épissage du MR, le variant MR₆, obtenu par l'exclusion de l'exon 6. Ce variant d'épissage exerce un effet dominant-négatif sur la signalisation minéralocorticoïde. Enfin, l'identification de microARN modulés par l'hypertonie suggère leur rôle potentiel dans le contrôle de la signalisation minéralocorticoïde rénale.

La caractérisation de ces mécanismes inédits modulant l'action du MR améliore notre compréhension de la physiopathologie de la signalisation minéralocorticoïde, et pourrait aboutir, à terme, à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Title : Posttranscriptional Control of Renal Mineralocorticoid Receptor by Variations of Extracellular Tonicity: Pathophysiological Consequences

Keywords: Mineralocorticoid receptor, Aldosterone, Extracellular tonicity, RNA-Binding Protein, Alternative splicing.

Abstract: Aldosterone and the Mineralocorticoid Receptor (MR) participate to the control of salt and water balance and the arterial pressure. Alteration of renal MR expression or mineralocorticoid signaling pathway contributes to the development of numerous human disorders. In this work, we have demonstrated the major role played by the RNA-Binding Proteins, Tis11b and HuR, in the control of MR expression in response to variations of extracellular tonicity in a model of principal tubular cells and *in vivo*. Hypertonicity (500 mOsmol/L) increases the expression of Tis11b, which binds the 3' untranslated region of MR transcript and accelerates the degradation of MR transcript, leading to the reduction of the mineralocorticoid signaling.

Conversely, hypotonicity (150 mOsmol/L) stimulates nuclear-cytoplasmic shuttling of HuR protein, which stabilizes MR transcript increasing its expression and renal sensitivity to aldosterone action. Furthermore, HuR participates to the editing of the novel MR₆ splice variant, which lacks exon 6, and exerts a dominant negative effect on mineralocorticoid signaling.

Finally, we have provided evidence that hypertonicity modulates expression of microRNA, which may control mineralocorticoid signaling pathway.

Characterization of these original mechanisms modulating MR action is pivotal for a better understanding of mineralocorticoid-related pathophysiology, and should ultimately lead to the development of new therapeutic strategies

Intitulé et adresse du laboratoire où la thèse a été effectuée :

Inserm U1185, Signalisation Hormonale, Physiopathologie Endocrinienne et Métabolique
Faculté de Médecine Paris Sud, 63 rue Gabriel Péri, 94276, Le Kremlin-Bicêtre Cedex
Directeur : Dr Marc Lombès

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

