



**HAL**  
open science

# Homéostasie du potassium : étude des mécanismes physiologiques impliqués lors d'une restriction potassique et au cours de la gestation

Samia Lasaad

► **To cite this version:**

Samia Lasaad. Homéostasie du potassium : étude des mécanismes physiologiques impliqués lors d'une restriction potassique et au cours de la gestation. Endocrinologie et métabolisme. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS147 . tel-04164626

**HAL Id: tel-04164626**

**<https://theses.hal.science/tel-04164626>**

Submitted on 18 Jul 2023

**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.

**THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE  
UNIVERSITÉ**

*École doctorale « Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique »  
(ED394)*

Réalisée au Centre de Recherche des Cordeliers (INSERM UMRS 1138) au sein  
de l'équipe « Physiologie rénale et Tubulopathies » (CNRS ERL 8228)

**Homéostasie du potassium : Étude des mécanismes  
physiologiques impliqués lors d'une restriction  
potassique et au cours de la gestation.**

Présentée par  
**Mme. Samia LASAAD**

Dirigée par  
**Dr. Gilles CRAMBERT**

Soutenue publiquement le 27 janvier 2022 devant le jury composé de :

Dr. Juliette HADCHOUEL  
Dr. Isabelle RUBERA  
Pr. Laurence DRAIN DUBOURG  
Pr. Emmanuel LETAVERNIER  
Dr. Cédric MORO

Présidente du jury  
Rapporteuse  
Rapporteuse  
Examineur  
Examineur

## REMERCIEMENTS

*Avant tout, je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce recueil des travaux que j'ai effectués durant 3 années et quelques mois de doctorat.*

*Je remercie énormément mon directeur de thèse, Gilles Crambert, pour sa patience, sa gentillesse, sa sagesse et sa bienveillance. Merci de m'avoir fait confiance, et de m'avoir donné l'opportunité de partager nos résultats à différents congrès nationaux et internationaux. Merci d'avoir toujours été présent et à l'écoute, même quand une pandémie frappait le monde. Tu es le modèle de mentor que je souhaiterais être plus tard.*

*Je tiens également à remercier Lydie Cheval, Chloé Rafael et Christine Walter, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et qui ont été mon premier repère à mon arrivée au laboratoire. Merci pour votre gentillesse, votre patience, vos précieux conseils et d'avoir partagé avec moi vos connaissances qui m'ont été essentielles tout au long de ma thèse.*

*Je remercie sincèrement Luciana Morla. Merci pour tes précieux conseils et ta pédagogie. Je n'oublierai jamais nos journées de microperfusion qui, bien que longues, étaient super à tes côtés.*

*Je tiens à remercier spécialement Nadia Frachon. Merci pour toutes tes recommandations de supers polars, ta gentillesse, et la bonne humeur que tu dégages chaque jour au laboratoire.*

*Bien évidemment je remercie tous les membres du laboratoire de physiologie rénale et tubulopathies du Centre de Recherche des Cordeliers, Pascal Houillier, Caroline Bertoye, Gaëlle Brideau, Sylvie Demaretz, Kamel Laghmani, Stéphane Lourdel, Marc Paulais, Clément Doucet, Alain Doucet, Gabrielle Planelles, Nadine Bouby, François Alhenc-Gelas, et Dalila Haker. Merci pour votre accueil chaleureux et pour tous ces moments passés à vos côtés.*

*Je remercie chaleureusement mes collègues étudiantes, Élise De Combiens, Mélanie Try, Camille Griveau, Dalal Douaihy, et Imène Sakhi. Merci d'avoir rendu cette aventure encore plus belle. Merci pour ces moments sérieux d'échanges sur nos projets, mais aussi pour tous les fous rires. Je vous souhaite à toutes un épanouissement personnel et professionnel.*

*Merci également aux collaborateurs sans qui ce projet n'existerait pas, Nicolas Picard, Anne Blanchard, Yves Fromes et Béatrice Matot.*

*Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis. Je remercie particulièrement mes parents : merci de m'avoir insufflé le courage de croire en mes rêves.*

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>4</b>
<b>I. PHYSIOLOGIE RENALE .....</b>	<b>5</b>
1. Anatomie .....	5
a. Structure macroscopique du rein.....	5
b. Ultrastructure du néphron .....	6
2. Fonctions du rein .....	7
<b>II. LES PRINCIPAUX TRANSPORTS D'IONS ET DE SOLUTES LE LONG DU NEPHRON.....</b>	<b>8</b>
1. Le tubule proximal .....	8
2. L'anse de Henle.....	10
3. Le tubule contourné distal.....	11
4. Le tubule connecteur et le canal collecteur.....	12
a. Les cellules principales .....	13
b. Les cellules intercalaires de type A.....	13
c. Les cellules intercalaires de type B .....	14
<b>III. HOMEOSTASIE DU POTASSIUM.....</b>	<b>15</b>
1. La balance interne de l'homéostasie potassique .....	17
2. Balance externe de l'homéostasie potassique : l'excrétion intestinale de potassium.....	18
3. Balance externe de l'homéostasie potassique : l'excrétion rénale de potassium.....	19
a. Homéostasie du K <sup>+</sup> au niveau du tubule contourné distal .....	21
b. Les mécanismes cellulaires du transport de K <sup>+</sup> par les cellules principales .....	22
c. Les mécanismes cellulaires du transport de K <sup>+</sup> par les cellules intercalaires de type A.....	24
4. L'hyperkaliémie.....	25
a. Épidémiologie .....	25
b. Conséquences d'une hyperkaliémie .....	25
c. Origines de l'hyperkaliémie .....	26
5. L'hypokaliémie.....	27
Épidémiologie.....	27
a) Conséquences d'une hypokaliémie .....	27
b) Les pertes extrarénales de potassium .....	28
c) Les pertes rénales de potassium .....	29
<b>IV. OBJECTIFS.....</b>	<b>30</b>
<b>PREMIERE ETUDE : ADAPTATION A UNE RESTRICTION POTASSIQUE.....</b>	<b>32</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>33</b>
1. Généralités .....	33
2. Le facteur de croissance GDF15.....	34
a) Historique.....	34
b) Structure et voies de signalisations .....	34
c) Régulation de l'expression de GDF15 et de sa concentration plasmatique.....	38
d) Rôles physiologiques de GDF15.....	39
3. Objectif de l'étude .....	43
<b>II. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>44</b>
1. Modèle d'étude.....	44
2. Analyses métaboliques .....	44
a) Analyse des échantillons d'urine humaine.....	44
b) Analyse des urines des souris en cage à métabolisme.....	45
c) Analyse de la kaliémie des souris, de la concentration musculaire en K <sup>+</sup> , de la concentration de GDF15 dans le plasma et dans les tissus.....	46
d) Analyse de la masse maigre, de la masse grasse et du fluide extracellulaire par TD-RMN.....	46

e) Analyse des de la masse musculaire des membres postérieurs par RMN .....	47
3. Analyses biochimiques et biomoléculaires .....	47
a) Extractions d'ARN et RT-qPCR .....	47
b) Marquages fluorescents des canaux collecteurs de la médullaire externe et des coupes de muscles.....	49
4. Présentation et analyses statistiques des résultats .....	50
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>51</b>
1. <i>GDF15 est augmenté en réponse à un régime faible en potassium.....</i>	<i>51</i>
2. <i>L'adaptation rénale à un régime faible en potassium est altérée en absence de GDF15 .....</i>	<i>53</i>
3. <i>L'absence de GDF15 altère l'augmentation du nombre de cellules intercalaires de type A.....</i>	<i>54</i>
4. <i>Les effets de GDF15 sur l'augmentation du nombre de cellules intercalaires de type A passe par le récepteur ErbB2.....</i>	<i>55</i>
5. <i>L'absence de GDF15 induit des modifications de la structure musculaire en réponse à un régime faible en potassium. ....</i>	<i>57</i>
<b>IV. DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>60</b>
1. <i>GDF15 régule la réponse rénale à un régime faible en potassium.....</i>	<i>60</i>
2. <i>Les effets extrarénaux de GDF15 en réponse à une restriction potassique .....</i>	<i>62</i>
<b>V. ARTICLE DU PROJET.....</b>	<b>64</b>
<b>DEUXIEME ETUDE : HOMEOSTASIE DU POTASSIUM AU COURS DE LA GESTATION .....</b>	<b>88</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>89</b>
<b>II. ARTICLE DU PROJET.....</b>	<b>91</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>100</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>101</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>121</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>121</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 : Schéma d'une coupe longitudinale d'un rein, représentant ses structures anatomiques.....</b>	<b>5</b>
<b>Figure 2 : Schéma de l'unité fonctionnelle du rein - le néphron (A) et d'une coupe longitudinale du corpuscule de Malpighi (B).....</b>	<b>7</b>
<b>Figure 3 : Schéma représentant les principales voies de réabsorption du tubule proximal.....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 4 : Schéma représentant les principales voies de transports de la branche large ascendante de l'anse de Henle.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 5 : Schéma représentant les principales voies de transports du tubule contourné distal.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 6 : Représentation schématique des types cellulaires et des transports ioniques présents dans le tubule connecteur et canal collecteur. CP : Cellules principales, ICA : Cellule intercalaire de type A, ICB : Cellule intercalaire de type B.....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 7 : Les effets de la variation de la concentration plasmatique de potassium sur le potentiel de repos membranaire d'une cellule excitable. Une concentration de potassium (<math>K^+</math>) plasmatique élevée rend le potentiel de repos membranaire moins négatif et diminue l'excitabilité en inactivant les canaux sodium responsables de la phase dépolarisante du potentiel d'action. Une valeur plasmatique de potassium faible hyperpolarise le potentiel de repos membranaire et réduit ainsi l'excitabilité car un stimulus plus important est nécessaire pour induire une dépolarisation et atteindre le seuil d'excitation.....</b>	<b>16</b>
<b>Figure 8 : Représentation schématique de l'homéostasie du potassium. Notre organisme est constitué en moyenne de 55 mmol/kg de poids corporel de <math>K^+</math>. 98% du <math>K^+</math> est intracellulaire, les 2% restant sont extracellulaires. L'organisme a pour objectif de maintenir la concentration en <math>K^+</math> extracellulaire (kaliémie) dans des valeurs physiologiques étroites. Pour cela, le <math>K^+</math> peut être absorbé ou libéré des compartiments intracellulaires (balance interne) d'une part, et réabsorbé ou excrété par les reins et l'intestin, d'autre part (balance externe). GR : Globules rouges.....</b>	<b>17</b>
<b>Figure 9 : Représentation schématique du transport de potassium au niveau du colonocyte. Processus de sécrétion et réabsorption par les colonocytes selon leur localisation. Les colonocytes présents au niveau de la crypte sont capables de sécréter du <math>K^+</math> alors que les colonocytes présents au niveau de la surface des villosités sont capables de sécréter et réabsorber du <math>K^+</math> grâce à l'expression de la HKA2.....</b>	<b>19</b>
<b>Figure 10 : Transport de potassium le long du néphron. L'excrétion finale de <math>K^+</math> dépend de la quantité de <math>K^+</math> réabsorbé ou sécrété au niveau du néphron distal et du canal collecteur. Les pourcentages correspondent à la quantité de <math>K^+</math> filtré réabsorbé ou sécrété. A gauche, 15 à 80% du <math>K^+</math> filtré est excrété lors d'un régime normal ou riche en <math>K^+</math>. A droite, 1% du <math>K^+</math> filtré est excrété lors d'une restriction potassique. PT : Tubule proximal. TAL : Branche large ascendante de Henle. DT : néphron distal. CD : Canal collecteur.....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 11 : Mécanismes de régulation du canal ENaC par l'aldostérone via la kinase SGK et l'ubiquitine ligase Nedd4-2. En absence d'aldostérone, Nedd4-2 se lie au canal ENaC et l'ubiquitine induisant une endocytose puis une dégradation du canal. En présence d'aldostérone, il y a synthèse de la kinase SGK qui phosphoryle Nedd4-2, empêchant la dégradation d'ENaC, favorisant son expression à la membrane plasmique.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 12 : Structure du gène murin codant la protéine GDF15. (Figure modifiée de Assadi et al. , 2020) .</b>	<b>35</b>
<b>Figure 13 : Représentation des différentes formes de GDF15. (Figure modifiée de Assadi et al. , 2020).....</b>	<b>35</b>
<b>Figure 14 : Schéma des voies de signalisations induites par GDF15 via le récepteur GFRAL.....</b>	<b>36</b>
<b>Figure 15 : Schéma de la structure du récepteur ErbB2 (HER2).....</b>	<b>37</b>
<b>Figure 16 : Schéma des mécanismes de signalisations mis en place au niveau des cellules intercalaires de type A, impliquant GDF15 et le récepteur ErbB2 dans le cadre d'une acidose métabolique. La charge acide stimule la synthèse de vasopressine, qui induit la production d'AMPc et des kinases AMP-dépendantes via sa liaison au récepteur Avpr2. Les deux isoformes AMPK<math>\alpha_1</math> et AMPK<math>\alpha_2</math> sont nécessaires à la production de Na<math>^+</math>,K<math>^+</math>-ATPase et p53, respectivement. Dans ce contexte, p53 permet la production de GDF15.....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 17 : Photo légendée d'une cage à métabolisme.....</b>	<b>45</b>

**Figure 18 : Photographies des différentes parties microdisséquées du néphron.** PCT : Tubule contourné proximal. PST : Partie droite du tubule proximal. TAL : Branche large ascendante de l'anse de Henle. DCT : Tubule contourné distal. CNT : Tubule connecteur. CD : Canal collecteur. .... 47

**Figure 19 : Séquences des primers**..... 48

**Figure 20: Analyse de la production de GDF15 en réponse à une restriction potassique chez la souris.** (A) Concentration urinaire de GDF15, normalisée par la créatinine urinaire, provenant de souris en régime standard (NK) ou après 1 à 4 jours de restriction potassique (LK). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=10), analysés à l'aide d'un test ANOVA à un facteur suivi d'une comparaison multiple avec pour contrôle le groupe NK (\*\*p<0.01, \*p<0.05). (B) Concentration plasmatique de GDF15 de souris en régime standard (NK) ou après 4 jours de restriction potassique (LK). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=5), analysés à l'aide d'un test T de Student (\*\*p<0.01). (C) Expression de l'ARNm codant pour GDF15 le long du tubule proximal contourné (PCT), droit (PST), de la zone médullaire et cortical de la branche ascendante large de l'anse de Henle (m et cTAL), du tubule contourné distal (DCT), du tubule connecteur (CNT) et du canal collecteur médullaire et cortical (CCD et OMCD) de souris soumises à un régime standard (NK) ou après 4 jours de restriction potassique (LK). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=5), analysés par comparaison de l'effet du régime dans chaque segment indépendamment des autres via un test Mann-Whitney (\*\*p<0.01, \*p<0.05). (D) Mesure de l'expression protéique de GDF15 dans le muscle (gastrocnemius), l'iléum et le côlon par ELISA sur tissus de souris soumises à un régime standard (NK) ou après 4 jours de restriction potassique. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=6), analysés à l'aide d'un test Mann-Whitney (\*\*p<0.01). .... 52

**Figure 21 : Analyse de la production de GDF15 en réponse à une restriction potassique chez l'humain.** Les groupes d'humains volontaires sains en régime standard (NK, n=9) ou en restriction potassique (LK, n=10) ont précédemment été caractérisés, voir Blanchard et al. 2019. (A) Kaliémie des volontaires sains en régime standard (NK) ou en restriction potassique (LK). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM, analysés par un test Wilcoxon (\*p<0.05). (B) Expression urinaire de GDF15 mesurée par ELISA. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM, analysés par un test Wilcoxon (\*p<0.05). (C) Corrélations linéaires de volontaires sains en régime standard (NK) et (D) en restriction potassique effectuées à l'aide d'une régression linéaire. .... 53

**Figure 22 : Conséquences physiologiques de l'absence de GDF15.** (A) Excretion urinaire de K<sup>+</sup> normalisée par la créatinine urinaire de souris, en régime standard (NK) ou pendant 14 jours de restriction potassique (LK), WT (cercles blancs) ou GDF15<sup>-/-</sup> (cercles noirs). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM, analysés par un test ANOVA à deux facteurs, suivi d'une comparaison multiple (\*\*p<0.01, \*p<0.05). (B) Kaliémie des souris WT (cercles blancs) et GDF15<sup>-/-</sup> (cercles noirs) en régime standard (NK) ou après 4 ou 10 jours de restriction potassique. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM, analysés par un test ANOVA à deux facteurs, suivi d'une comparaison multiple (\*\*p<0.01, \*p<0.05)..... 54

**Figure 23 : Étude de la prolifération des cellules intercalaires de type A en réponse à 4 jours de restriction potassique.** (A) Exemples de résultats d'immunofluorescence obtenus au microscope confocal, de canaux collecteurs médullaires (OMCD) de souris WT ou GDF15<sup>-/-</sup>, sous un régime standard ou après 4 jours de restriction potassique. Marquage des noyaux au DAPI (bleu) et de l'échangeur AE1 (rouge). Les acquisitions stack ont été utilisées pour reconstituer les tubules en 3D afin de compter précisément le nombre de noyaux (B), le nombre de cellules AE1 positives, et le pourcentage de cellules AE1 positives formant des doublets (D) chez des souris WT (symboles ronds) ou GDF15<sup>-/-</sup> (symboles carrés), sous un régime standard (NK, symboles blancs) ou après 4 jours de restriction potassique (LK, symboles noirs). Chaque symbole représente la moyenne de 7 à 11 tubules du même animal. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=5-6), analysés par un test Mann-Whitney (\*\*p<0.01). (E) Expression de l'ARNm codant pour la Cycline D1 chez les souris WT (symboles cercles) et GDF15<sup>-/-</sup> (symboles carrés), sous régime standard (NK, symboles blancs) ou après 2 ou 4 jours de restriction potassique (LK, symboles noirs). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=6-10), analysés par un test ANOVA à deux facteurs, suivi d'une comparaison multiple (\*\*p<0.01, \*p<0.05). .... 56

**Figure 24 : Étude du récepteur ErbB2 dans le cadre d'une restriction potassique.** (A) Expression de l'ARNm codant pour le récepteur ErbB2 dans des échantillons de reins totaux, de tubules connecteurs (CNT), de canaux collecteurs corticaux et médullaires (CCD et OMCD). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=5-6), analysés par comparaison de l'effet du régime dans chaque segment indépendamment des autres via un test Mann-Whitney (\*\*p<0.01, \*p<0.05). (B) Kaliémie des souris WT lors d'un régime standard (symboles blancs) ou après 4 jours de restriction potassique (symboles noirs), traitées ou non avec du mubritinib. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=5-7), analysés par un test ANOVA à deux facteurs, suivi d'une comparaison multiple (\*\*p<0.01, \*p<0.05). Nombre de noyaux (C), de cellules AE1 positives

(D) et de doublets de cellules AE1 positives (E) chez des souris après 4 jours de restriction potassique, traitées ou non avec du mubritinib. Chaque symbole représente la moyenne de 7 à 11 tubules du même animal. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=4-5), analysés par un test Mann-Whitney (\*\*p<0.01).

..... 57

**Figure 25: Analyses des muscles de souris en réponse à une restriction potassique.** (A) Concentration en K<sup>+</sup> des gastrocnemius des souris WT (cercles) et GDF15<sup>-/-</sup> (carrés) en régime standard (NK, symboles blancs) et après 4 jours de restriction potassique (LK, symboles noirs). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=10-20), analysés par un test ANOVA à un facteur, suivi d'une comparaison multiples des moyennes (\*\*p<0.01, \*p<0.05). (B) Fréquence de distribution des aires des fibres musculaires des quadriceps de souris WT (histogrammes gris, trait plein) et GDF15<sup>-/-</sup> (histogrammes rouges, trait pointillés) après une restriction potassique de 4 jours. n=3, 2 coupes par souris et 8197 et 8734 fibres analysées pour les souris WT et GDF15<sup>-/-</sup>, respectivement. (C) Exemple d'une image RMN des muscles postérieurs de souris WT en restriction potassique. Les régions colorées correspondent à la région d'intérêt, utilisées pour l'analyse de la surface musculaire. Les mesures ont été effectuées chez des souris WT (cercles noirs) et GDF15<sup>-/-</sup> (carrés noirs) en régime standard ou après 4 jours de restriction potassique. La différence de surface a été mesurée entre le régime standard et après la restriction potassique pour un même animal. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=6), analysés avec un test T de Student, non pairé (\*p<0.05). (D) Concentration de la créatine kinase (CK) plasmatique des souris WT (cercles) et GDF15<sup>-/-</sup> (carrés) après 4 jours de restriction potassique. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=14), analysés avec un test T de Student, non pairé (\*p<0.05). (E) et (F) Analyse de l'expression ARNm des gènes Trim63 et Fxbo32, respectivement, dans des muscles de souris WT (cercles noirs) et GDF15<sup>-/-</sup> (carrés noirs) après 4 jours de restriction potassique. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=6), analysés avec un test T de Student, non pairé (\*\*p<0.01). ..... 59



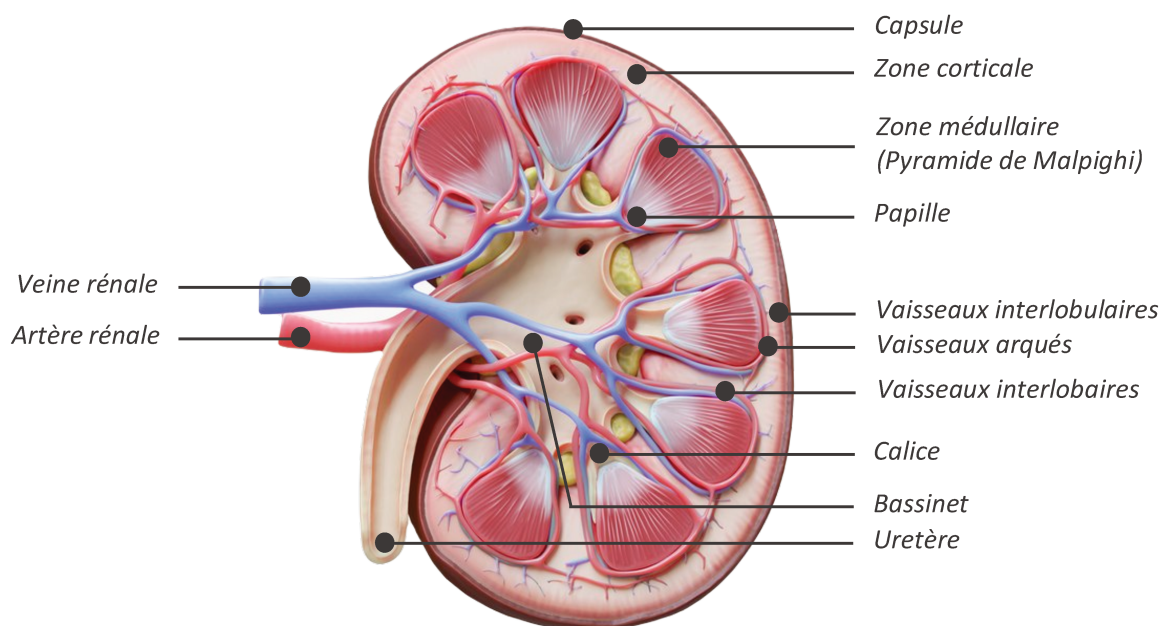
# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

# I. Physiologie rénale

## 1. Anatomie

### a. *Structure macroscopique du rein*

Les reins sont localisés dans la zone postérieure de l'abdomen, de part et d'autre de la colonne vertébrale, entre la douzième vertèbre thoracique et la troisième lombaire. Ils sont surmontés d'une glande surrénale, organe appartenant au système endocrinien. Chaque rein est relié à la circulation sanguine par une artère et une veine rénale, et est entouré d'une capsule fibreuse sous laquelle se trouve le parenchyme rénal. Ce parenchyme est composé de deux régions distinctes : la zone périphérique dite corticale (ou cortex) qui recouvre la zone interne dite médullaire (ou médulla). Chez l'Homme, la zone médullaire est constituée de plusieurs lobes en forme de cônes appelés pyramides de Malpighi dont les sommets, appelés papilles, débouchent dans les calices. Les calices donnent naissance au bassinet qui recueille l'urine formée dans le tissu rénal et en assure l'écoulement dans la vessie *via* l'uretère [voir **Figure 1**] (Giebisch, 2013).



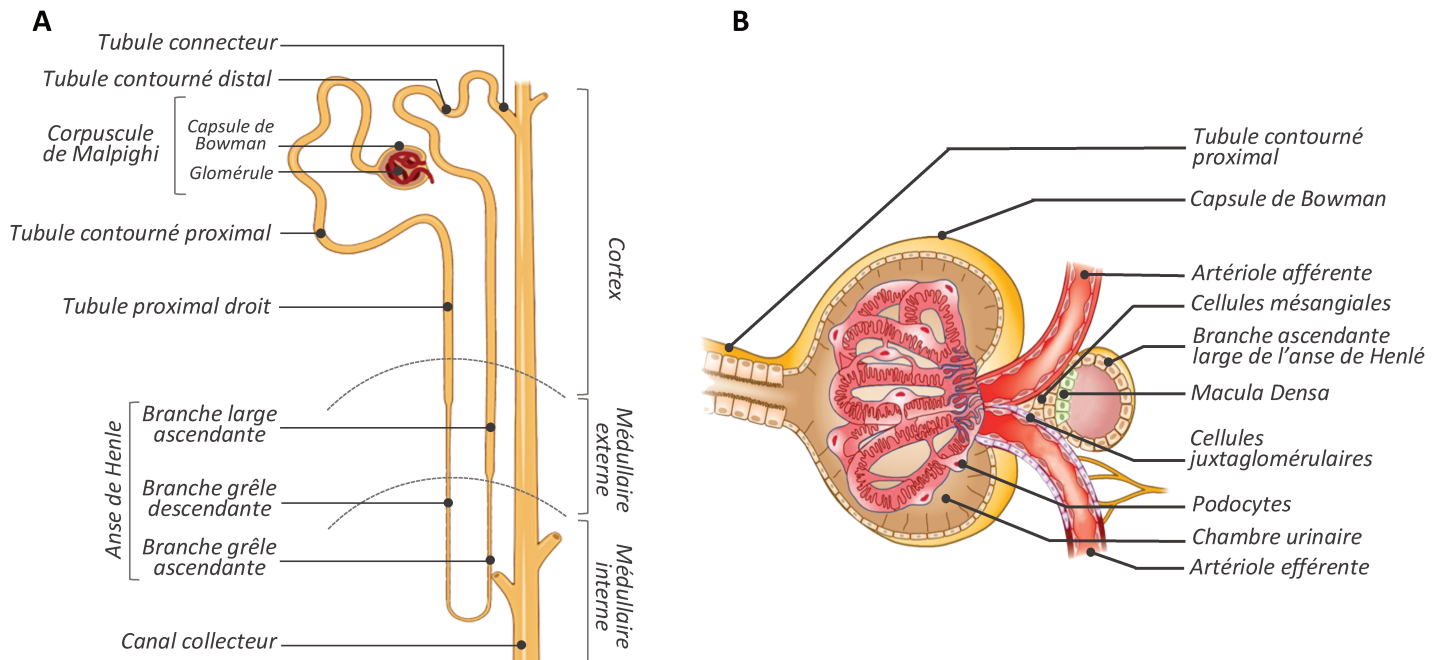
**Figure 1** : Schéma d'une coupe longitudinale d'un rein humain, représentant ses structures anatomiques.

### *b. Ultrastructure du néphron*

Chez l'Homme, chaque rein est constitué d'environ 1 million de néphrons (contre 35 000 chez le rat). Il est l'unité fonctionnelle et structurale du rein et chaque néphron est composé de différents segments. Le corpuscule de Malpighi (aussi appelé corpuscule rénal) forme la première partie du néphron. Il permet la filtration du plasma et la formation de l'urine primitive. Il est constitué d'une capsule épithéliale appelée « capsule de Bowman » qui enveloppe un réseau capillaire en peloton appelé « glomérule ». Le glomérule est situé entre une artériole afférente, qui permet l'arrivée du sang circulant, et une artériole efférente. La capsule de Bowman est formée de deux feuillets, un feuillet pariétal (externe) et un feuillet viscéral (interne). Les deux sont séparées par une cavité appelée « chambre urinaire » où s'accumule le sang filtré appelé « ultrafiltrat ». Alors que le feuillet pariétal est composé d'un épithélium pavimenteux simple, le feuillet viscéral est composé de cellules épithéliales différenciées appelées « podocytes ». Les podocytes recouvrent, par leurs extensions appelées « pédicelles », les cellules endothéliales des capillaires glomérulaires et en association avec la membrane basale des capillaires forment la barrière de filtration glomérulaire. Cette barrière permet de retenir les grosses molécules supérieures à 68 kD ainsi que les cellules sanguines lors de la filtration du sang [voir **Figure 2B**].

L'urine primitive transite ensuite le long des différents segments tubulaires du néphron où elle sera transformée par différents mécanismes de réabsorption et de sécrétion afin de donner l'urine définitive. Le tubule proximal fait suite au corpuscule de Malpighi et forme plusieurs circonvolutions avant de descendre de manière rectiligne dans la médulla. Le segment suivant est l'anse de Henle, qui est composée de la branche grêle descendante qui se finit en épingle à cheveux et qui est suivie de la branche ascendante remontant vers le cortex. La fin de la branche large ascendante de l'anse de Henle possède des cellules différenciées, appelées macula densa (Giebisch, 2013). La macula densa est en contact avec les artérioles afférentes et efférentes du glomérule de ce même néphron formant l'appareil juxtaglomérulaire. Cette structure endocrine permet la régulation de chaque néphron, et la régulation du débit de filtration glomérulaire. C'est un biosenseur jouant un rôle central dans la détection des modifications de la composition du liquide tubulaire permettant d'adapter le fonctionnement rénal. En effet, les cellules de la macula densa sont capables de détecter la concentration de chlore (Cl<sup>-</sup>) environnant et de sécréter en réponse de l'adénosine, ou de la prostaglandine E2 pour inhiber ou stimuler la synthèse de rénine par les cellules juxtaglomérulaires (aussi appelées cellules granulaires). La rénine permet de maintenir l'homéostasie hydrosodée (Peti-Peterdi and Harris, 2010; Le *et al.*, 2013).

On trouve ensuite le tubule contourné distal et le tubule connecteur qui se lie au canal collecteur [voir **Figure 2A**]. Le canal collecteur n'est pas considéré comme faisant anatomiquement partie du néphron car il diffère de par son origine embryonnaire (Nagalakshmi and Yu, 2015).



**Figure 2** : Schéma de l'unité fonctionnelle du rein - le néphron (A) et d'une coupe longitudinale du corpuscule de Malpighi (B).

## 2. Fonctions du rein

En 1857, le physiologiste Claude Bernard formule le concept de milieu intérieur. Le réel milieu dans lequel nous vivons n'est pas le milieu extérieur composé d'air ou d'eau, mais le milieu intérieur dans lequel baignent nos organes. Les compartiments liquidiens représentent 60% de notre poids corporel et sont protégés par différents dispositifs physiologiques de sorte que leurs compositions ou leurs volumes ne soient pas impactés par des variations soudaines. Le rein est l'acteur majeur du maintien de cet équilibre. Il ajuste les excréations d'eau, de solutés et d'électrolytes aux apports et élimine les déchets de l'organisme. Son rôle dans le maintien de la composition et du volume du milieu intérieur participe au contrôle de la pression artérielle à travers la régulation du volume plasmatique (Taal, Brenner and Rector, 2012). Le rein joue également un rôle essentiel dans la régulation de l'équilibre acido-basique (pH plasmatique) et de l'osmolarité (290 mOsm/L). Il possède aussi une fonction endocrine, avec la synthèse 1/ de rénine qui permet de réguler la pression artérielle 2/d'érythropoïétine qui permet la production de globules rouges au niveau de la moelle osseuse et 3/ de calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) qui contrôle le métabolisme intestinal et osseux du calcium (Kurt and Kurtz, 2015).

Le débit de filtration glomérulaire (ou DFG) correspond au volume de plasma filtré par les reins par unité de temps. Chez l'Homme, il est d'environ 125 ml/min, formant chaque jour 180L d'ultrafiltrat glomérulaire. Au cours de chaque passage du sang dans les capillaires glomérulaires, une fraction de l'eau, des électrolytes et des petites molécules s'accumulent dans la chambre urinaire de la capsule de Bowman constituant ainsi l'ultrafiltrat (ou urine primitive). Cette ultrafiltration se réalise sous l'influence des forces de Starling. Les forces de Starling comprennent les pressions hydrostatiques (forces exercées par un liquide sur les parois de la surface qui contient ce liquide), oncotiques (forces osmotiques qui attirent l'eau en direction des protéines) et le coefficient de perméabilité du réseau capillaire.

Les différences de pressions entre les pressions hydrostatiques et oncotiques ( $P_{\text{hydrostatique}} > P_{\text{oncotique}}$ ) favorisent uniquement le passage du sang de la lumière des capillaires glomérulaires vers la chambre urinaire et évitent le passage inverse.

Le rein est capable de s'auto-réguler afin de maintenir constant le DFG malgré les variations de pressions artérielles. Une de ces régulations se fait au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire [voir la sous partie **b**]. Lors d'une augmentation du DFG, la concentration de NaCl augmente dans le fluide tubulaire. Les cellules de la macula densa de l'appareil juxtaglomérulaire détectent cette augmentation et produisent de l'adénosine qui va induire une vasoconstriction des artérioles afférentes et donc diminuer le DFG. Lors d'une diminution de la pression artérielle, le rein répond par une synthèse de rénine qui permet la production d'angiotensine II, puis d'aldostérone, permettant entre autres la vasoconstriction des artérioles afférentes (Le *et al.*, 2013).

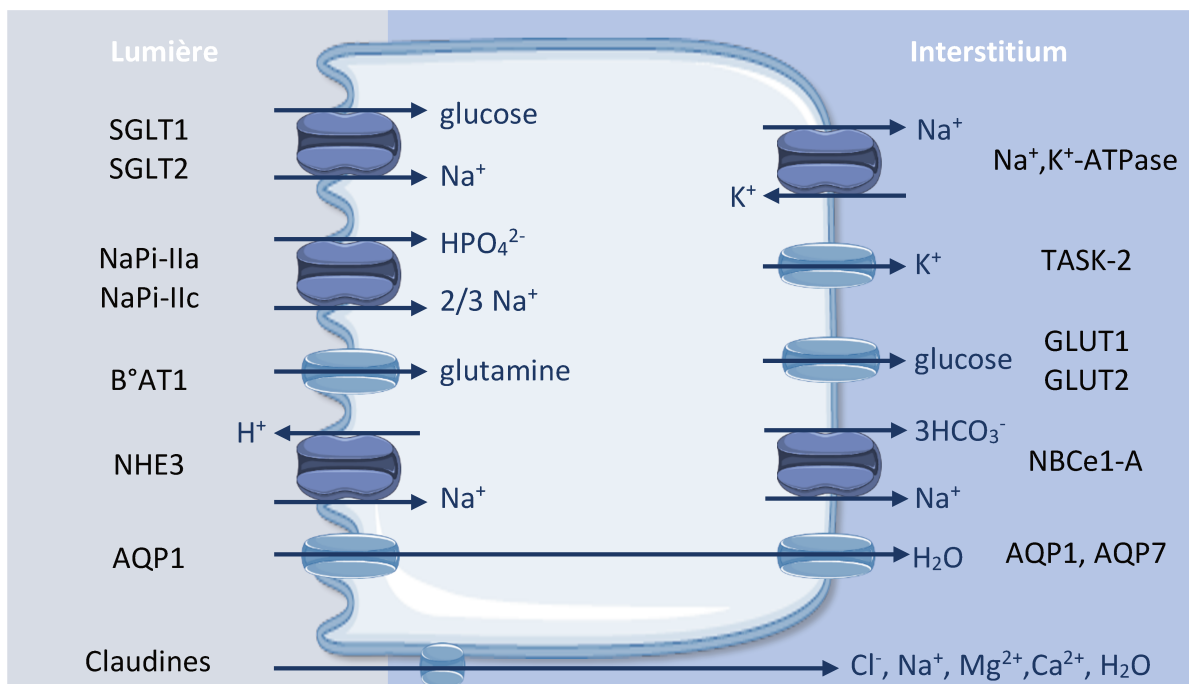
## II. Les principaux transports d'ions et de solutés le long du néphron

### 1. Le tubule proximal

Le tubule proximal fait suite au corpuscule rénal, il est la continuité du feuillet pariétal de la capsule de Bowman. Le tubule proximal est composé de 3 parties distinctes. Les segments S1 et S2, repliés sur eux-mêmes, formant le tubule contourné proximal (aussi appelé « pars convoluta »), localisés dans le cortex et le segment S3, rectiligne, formant le tubule proximal droit (aussi appelé « pars recta »), localisé dans la médullaire externe [voir **Figure 2**]. Les cellules du segment S1 possèdent des microvillosités à leur pôle apical, formant une bordure en brosse dans la lumière du tubule proximal. Au pôle basolatéral, elles présentent des invaginations de la membrane basale. Ces cellules sont aussi caractérisées par la présence

importante de mitochondries allongées. Caractéristiques marquées dans le segment S1 et qui s'amenuisent progressivement dans les segments S2 puis S3 (Zhuo and Li, 2013).

Ces caractéristiques cellulaires (microvillosités, ainsi que la forte présence de mitochondries) illustrent la capacité importante de réabsorption au niveau de cette zone du néphron. Le tubule proximal reçoit l'urine primitive filtrée par le glomérule, riche en molécules (protéines de bas poids moléculaire, amino-acides, glucose, eau...) et en ions (Pi, K<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, etc...). Il est capable de réabsorber la totalité des protéines de bas poids moléculaire, les amino-acides, et le glucose. Il réabsorbe aussi 80% des ions phosphates et bicarbonates, environ 60 à 70% d'eau et des ions Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, et environ 25% des ions Mg<sup>2+</sup> (Giebisch, 2013). Au pôle apical des cellules, le Na<sup>+</sup> est réabsorbé en parallèle du glucose, des ions phosphates, et bicarbonates *via* les transporteurs SGLT, Na-Pi et NBCe1 respectivement. Les amino-acides sont réabsorbés *via* le transporteur B<sup>o</sup>AT1 présent à la membrane apicale. L'eau, quant à elle, est réabsorbée *via* l'aquaporine 1 (AQP1). Cette zone du néphron joue aussi un rôle central dans la régulation de l'équilibre acido-basique en réabsorbant la majorité des ions bicarbonates et en produisant de l'ammoniaque, permettant aux protons d'être sécrétés sous forme d'ammonium (Taal, Brenner and Rector, 2012).

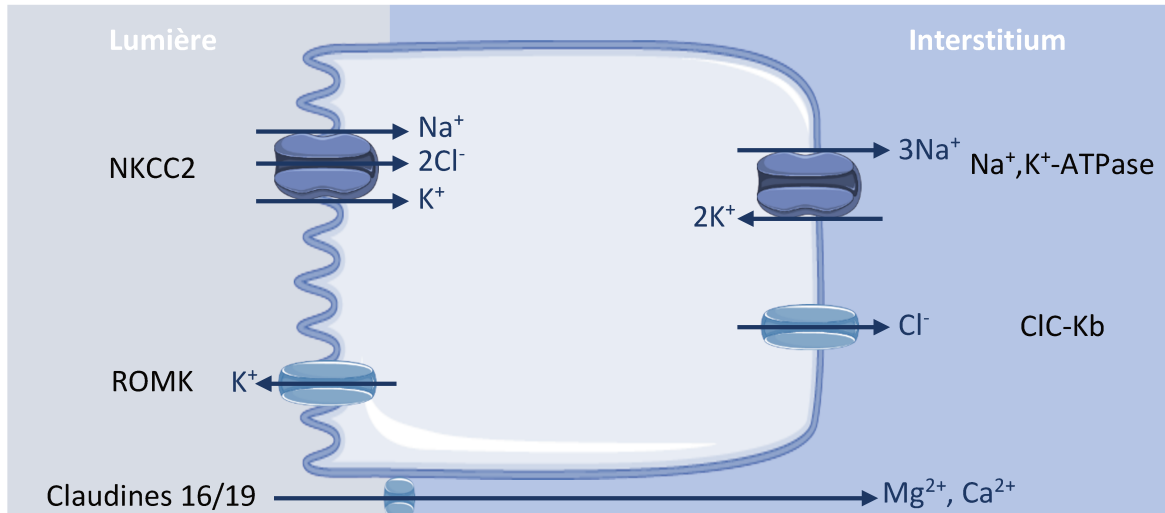


*Figure 3 : Schéma représentant les principales voies de réabsorption du tubule proximal.*

## 2. L'anse de Henle

L'anse de Henle débute à la suite du segment S3 du tubule proximal. Elle se replie sur lui-même, formant une structure en épingle à cheveux, et est composée de différents segments. Il existe deux types d'anses formant les néphrons juxtamédullaire (à anses longues) et les néphrons superficiels (à anses courtes). Les anses de Henle longues possèdent un segment fin appelé « branche grêle descendante » qui s'étend profondément dans la médulla interne. Le bout de la branche grêle descendante correspond à la pointe de l'anse et donne naissance au segment appelé « branche grêle ascendante » qui est suivi par le segment large appelé « branche large ascendante » qui remonte vers le corpuscule rénal situé dans le cortex. Les anses de Henle courtes ont une branche grêle descendante qui s'arrête au niveau de la médulla externe et elles ne possèdent pas de branche grêle ascendante (Taal, Brenner and Rector, 2012). A l'inverse du tubule proximal, les cellules présentes dans l'anse de Henle sont assez pauvres en mitochondries. C'est une zone du néphron particulièrement importante pour la réabsorption de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Environ 65% du  $\text{Mg}^{2+}$  et 25% du  $\text{Ca}^{2+}$  filtrés y sont réabsorbés *via* la voie paracellulaire à l'aide des claudines 16 et 19 (de Baaij, Hoenderop and Bindels, 2012; Hanna *et al.*, 2022). L'anse de Henle réabsorbe aussi 25% du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$  filtrés *via* le co-transporteur  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ , NKCC2 présent à la membrane apicale des cellules de la branche large ascendante. Cette protéine est la cible pharmacologique de traitements diurétiques administrés dans le cadre de l'hypertension artérielle, comme le furosémide (Wittner *et al.*, 1991).

La pompe  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase, présente à la membrane basolatérale, permet la formation d'un gradient électrochimique favorable au fonctionnement de NKCC2. Le  $\text{K}^+$  est recyclé au niveau apical *via* le canal ROMK [voir **Figure 4**]. L'imperméabilité à l'eau de la branche large ascendante entraîne une accumulation de NaCl dans l'interstitium qui contribue à la génération du gradient osmotique cortico-médullaire nécessaire à la conservation de l'eau. La branche large ascendante de Henle contribue également à l'homéostasie acido-basique par son rôle dans la réabsorption d'environ 15 à 20% du bicarbonate filtré et par son rôle dans la formation du gradient d'ammoniaque cortico-médullaire (Stern, Backman and Hayslett, 1985).

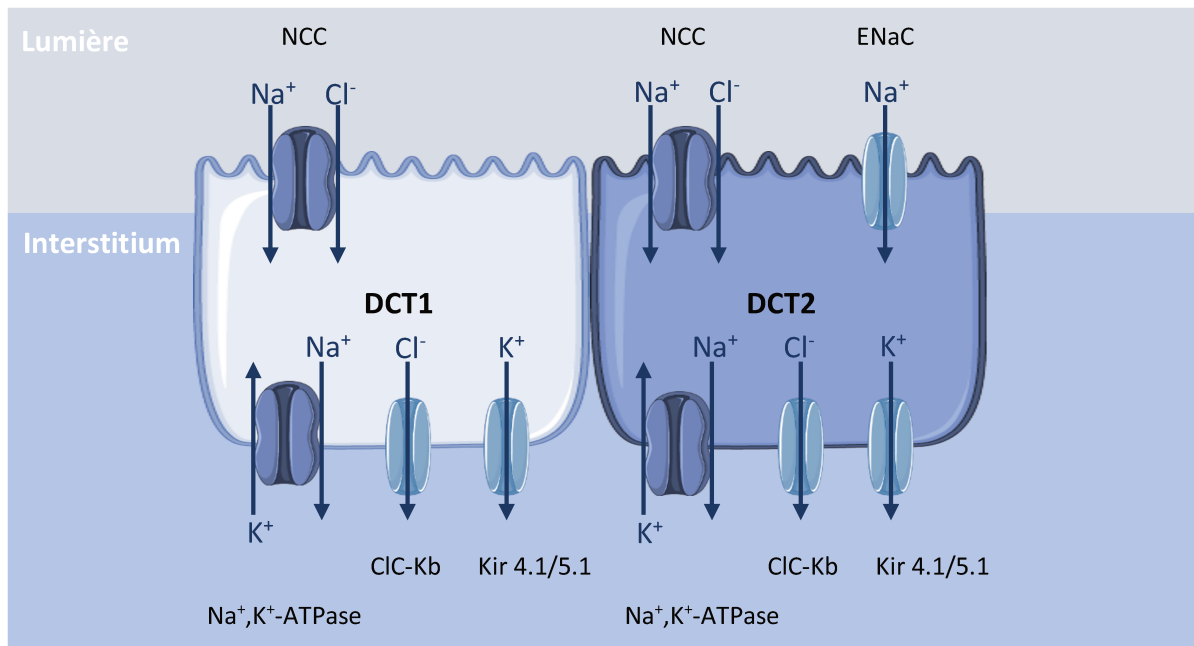


**Figure 4 :** Schéma représentant les principales voies de transports de la branche large ascendante de l'anse de Henle.

### 3. Le tubule contourné distal

**Le tubule contourné distal (DCT)** fait suite à l'anse de Henle, et forme une circonvolution. La membrane apicale des cellules est quasiment lisse. En revanche, comme dans le tubule proximal, la membrane basale présente des invaginations et les cellules possèdent un nombre important de mitochondries. C'est un segment de petite taille, mais essentiel dans la balance du NaCl et du  $\text{K}^+$ . Il peut être divisé en deux parties le tubule contourné distal 1 et 2 (DCT1, DCT2), composées de différents types cellulaires et pouvant être distinguées par leur réponse aux minéralocorticoïdes et le type de transporteur ionique présent. En effet, bien que les cellules du DCT1 et DCT2 expriment toutes le récepteur minéralocorticoïde, seules les cellules du DCT2 peuvent répondre de manière spécifique à une stimulation de l'aldostérone, car elles expriment l'enzyme  $11\beta\text{HSD2}$  qui inactive les glucocorticoïdes. La réabsorption de NaCl se fait via le co-transporteur  $\text{Na}^+, 2\text{Cl}^-$ , NCC qui est exprimé dans toutes les cellules du DCT mais seules les cellules du DCT2 expriment également le canal  $\text{Na}^+$  sensible à l'amiloride, ENaC [voir **Figure 5**]. NCC est sensible aux thiazides, traitement pharmacologique administré dans le cadre de l'hypertension. En plus de sa forte capacité à réabsorber du NaCl, le DCT est aussi un segment crucial dans l'homéostasie du  $\text{K}^+$ . Bien qu'il ne contribue pas directement à la sécrétion et à la réabsorption du  $\text{K}^+$ , le DCT contrôle la délivrance de  $\text{Na}^+$  aux segments suivants qui sécrètent du  $\text{K}^+$  de manière  $\text{Na}^+$ -dépendante. Le transport de  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  se fait en transcellulaire *via* les canaux TRPM6 et TRPV5, respectivement (Giebisch, 2013).





*Figure 5 : Schéma représentant les principales voies de transports du tubule contourné distal.*

#### 4. Le tubule connecteur et le canal collecteur

**Le tubule connecteur (CNT)** fait la jonction entre le tubule contourné distal et le canal collecteur. La longueur du tubule connecteur dépend du type de néphron ; juxtamédullaire ou superficiel. Étant donné que les tubules contournés distaux sont profonds dans les néphrons juxtamédullaires, les tubules connecteurs remontent tout le cortex du parenchyme rénal fusionnant avec plusieurs tubules contournés distaux avant de rejoindre le canal collecteur. A l'inverse, dans les néphrons superficiels le tubule connecteur joint directement le canal collecteur (McCormick and Ellison, 2014).

**Le canal collecteur (CD)** est rectiligne traversant le parenchyme rénal cortical et médullaire jusqu'aux papilles. Il collecte les urines d'une quinzaine de néphrons à la fois. Il est composé de différents segments ; le canal collecteur cortical (CCD), le canal collecteur de la médullaire externe (OMCD) et le canal collecteur de la médullaire interne (IMCD). Au niveau du CNT, CDD et OMCD nous retrouvons deux grands types cellulaires. Les cellules principales qui représentent 60 à 70% de la population cellulaire, et les cellules intercalaires qui représentent 30 à 40% de la population cellulaire. Les cellules intercalaires sont subdivisées en trois groupes, les cellules intercalaires de type A (ICA), les cellules intercalaires de type B (ICB) et les cellules intercalaires non-A non-B. Le ratio de cellules intercalaires change en fonction du segment du canal collecteur. Chez la souris, le CNT est riche en cellules intercalaires non-A non-B (Kim *et al.*, 1999). Le CCD contient les trois populations de cellules intercalaires. L'OMCD contient exclusivement des ICA. Au début de l'IMCD, nous retrouvons une population cellulaire similaire à l'OMCD. À la fin de l'IMCD, nous retrouvons une population cellulaire spécifique de l'IMCD appelée « cellules IMCD ». Ces dernières possèdent des propriétés fonctionnelles

mixtes entre les cellules principales et les ICA (Giebisch, 2013; Roy, Al-bataineh and Pastor-Soler, 2015).

#### *a. Les cellules principales*

Les cellules principales jouent un rôle dans le contrôle et le maintien de la volémie, et donc de la pression artérielle, mais aussi dans le contrôle de la concentration plasmatique de  $K^+$ . En effet, elles sont essentielles à la réabsorption de  $Na^+$ , d'eau et à la sécrétion de  $K^+$ . Elles possèdent, à leur membrane apicale, un cil capable de détecter le flux urinaire ainsi que des microvillosités qui permettent d'augmenter la surface d'échange (Pearce *et al.*, 2015). Les cellules principales expriment les canaux ENaC ( $Na^+$ ), ROMK ( $K^+$ ) et AQP2 ( $H_2O$ ) à leur membrane apicale et la pompe  $Na^+,K^+$ -ATPase ainsi que les canaux AQP3 et AQP4 à leur membrane basolatérale. La  $Na^+,K^+$ -ATPase permet la création d'un gradient électrochimique favorable à la réabsorption de  $Na^+$  et à la sécrétion de  $K^+$ . En effet, la pompe fait sortir du  $Na^+$  vers l'interstitium, créant un gradient électrochimique favorisant la réabsorption de  $Na^+$  en apical *via* le canal ENaC. Cette entrée apicale de  $Na^+$  favorise la sécrétion apicale de  $K^+$  via le canal ROMK (Wang and Giebisch, 2009) [voir **Figure 6**]. Les cellules principales sont sous le contrôle de la vasopressine (aussi appelée AVP) et de l'aldostérone. La vasopressine est une hormone antidiurétique qui permet d'induire la rétention d'eau en réponse à une déshydratation de l'organisme. L'augmentation de l'osmolarité plasmatique ou la diminution de la volémie induisent une synthèse d'AVP par l'hypothalamus. L'AVP, relargué par l'hypophyse, va alors induire *via* son récepteur V2 une stimulation de l'AQP2 permettant la réabsorption d'eau (Moeller and Fenton, 2012). Lors d'une baisse de la volémie, ou lorsqu'il y a trop de  $K^+$  dans le plasma, les glandes surrénales induisent une synthèse d'aldostérone. L'aldostérone est une hormone minéralocorticoïde qui va induire, *via* son récepteur minéralocorticoïde (MR), une activation du canal ENaC et donc une réabsorption massive de  $Na^+$ , permettant de rétablir la volémie. Cette réabsorption massive de  $Na^+$  favorise un gradient électrochimique induisant une sécrétion importante de  $K^+$  via ROMK, rétablissant ainsi la concentration de  $K^+$  dans le plasma (Pearce *et al.*, 2015).

#### *b. Les cellules intercalaires de type A*

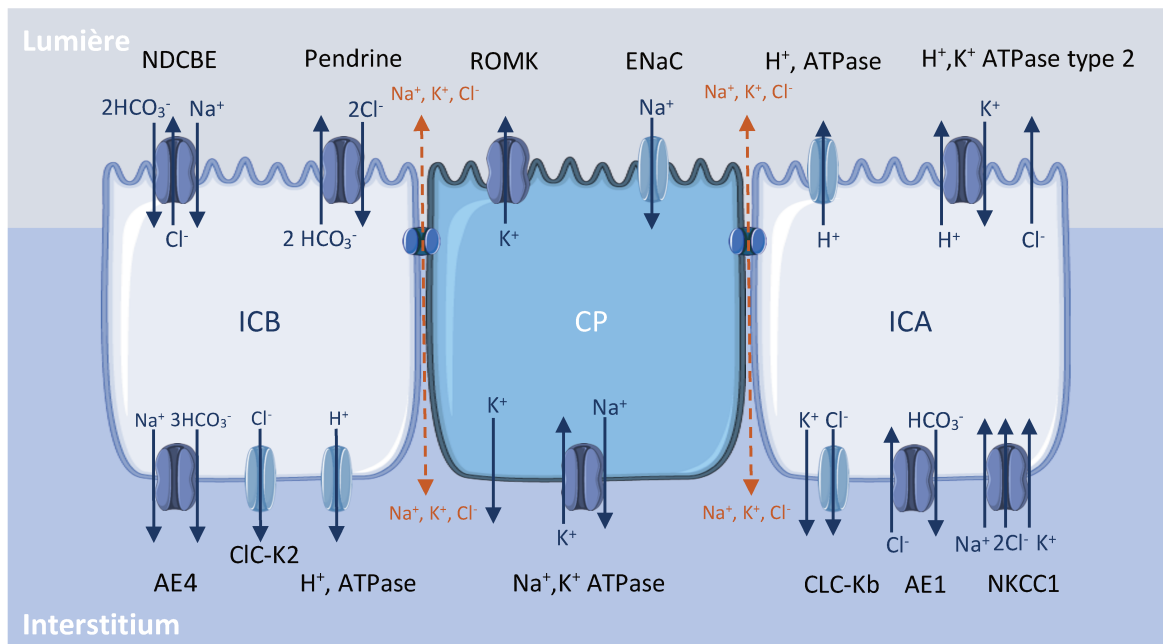
Les cellules intercalaires de type A possèdent des microvillosités à la membrane apicale et une quantité importante de mitochondries (Madsen, Verlander and Tisher, 1988). Leur rôle le mieux décrit et le plus étudié est la sécrétion de protons dans les urines, notamment dans le cas d'une acidose métabolique. Elles possèdent à leur membrane apicale la pompe  $H^+$ -ATPase, et à leur membrane basolatérale l'échangeur  $Cl^-/HCO_3^-$  AE1, permettant ainsi la sécrétion de proton, et la réabsorption d'ions bicarbonates. Une entrée de  $CO_2$  se fait à la membrane

basolatérale des ICA, où l'anhydrase carbonique (CAII) intracellulaire catalyse son hydratation avec une molécule d' $H_2O$ , pour produire un ion bicarbonate et un proton. Le proton est sécrété dans les urines *via* la pompe  $H^+$ -ATPase, et l'ion bicarbonate est réabsorbé vers l'interstitium *via* l'échangeur AE1 (Almomani *et al.*, 2014) [voir **Figure 6**]. La  $H^+$ -ATPase et AE1 sont stimulés lors d'une acidose métabolique (Bastani *et al.*, 1991). Les ICA expriment aussi la pompe  $H^+,K^+$ -ATPase de type 2 au pôle apical, qui permet la réabsorption de  $K^+$  lorsque l'organisme est en carence potassique ou durant la gestation, dans les deux cas sous l'action de la progestérone (Elabida *et al.*, 2011; Salhi *et al.*, 2013). Lors d'un régime riche en  $K^+$ , c'est le canal potassique BK, aussi présent à la membrane apicale, qui permet la sécrétion de  $K^+$  vers la lumière (Najjar *et al.*, 2005). En plus de leur rôle dans l'équilibre acido-basique et potassique de l'organisme, il a récemment été démontré par notre laboratoire que les ICA intervenaient aussi dans la balance du  $Na^+$ . En effet, elles expriment à la membrane basolatérale un co-transporteur  $Na^+, K^+, 2Cl^-$ , NKCC1 qui permet l'entrée de NaCl dans la cellule depuis l'interstitium. Le  $Na^+$  est alors sécrété à la membrane apicale via la pompe versatile HKA2, qui est aussi capable de fonctionner en tant que  $Na^+, K^+$ -ATPase (Morla *et al.*, 2016). Il a également été démontré que les ICA servent à la fois de sentinelles et d'effecteurs dans la défense contre les infections urinaires. Elles sont capables de se lier aux bactéries pathogènes *E. Coli* et d'induire en réponse une acidification des urines ainsi que la sécrétion de la protéine bactériostatique lipocaline 2 (aussi appelée NGAL). La lipocaline 2 permet de priver les bactéries des molécules de fer de l'hôte essentielles à leur développement (Paragas *et al.*, 2014).

### *c. Les cellules intercalaires de type B*

Les cellules intercalaires de type B sont impliquées dans la sécrétion d'ions bicarbonates. Elles présentent une polarité quasiment opposée à celles des ICA, exprimant la pompe  $H^+$ -ATPase en basolatérale et un échangeur  $Cl^-/HCO_3^-$  (Pendrine) à la membrane apicale. Cela permettant la sécrétion d'ions bicarbonates et la réabsorption de protons (Brown, Hirscht and Gluck, 1988; Royaux *et al.*, 2000). Les ICB contribuent également à la réabsorption électroneutre de NaCl. En effet, la pendrine fonctionne en tandem avec l'échangeur  $HCO_3^-$ ,  $Na^+/Cl^-$ , NDCBE afin de permettre la réabsorption neutre d'une molécule de  $Na^+$  et de  $Cl^-$ . Les ions  $Cl^-$  sortent vers l'interstitium via le canal ClC-K2 exprimé au niveau de la membrane basolatérale. Et les ions  $Na^+$  et  $HCO_3^-$  rejoignent l'interstitium *via* le co-transporteur  $Na^+/HCO_3^-$  AE4 (Roy, Al-bataineh and Pastor-Soler, 2015) [voir **Figure 6**]. L'expression de la pendrine, spécifique aux ICB, est diminuée lors d'une acidose métabolique et stimulée lors d'une alcalose métabolique (Royaux *et al.*, 2000; Hafner *et al.*, 2008). L'aldostérone et l'angiotensine II augmentent également les niveaux de pendrine (Verlander *et al.*, 2011; Wall, 2016). De plus,

la pendrine modifie l'activité du canal ENaC en partie en modifiant la concentration lumineuse de  $\text{HCO}_3^-$  (Wall, 2016). Cela fait de la pendrine une cible thérapeutique potentielle pour le contrôle de la pression artérielle.

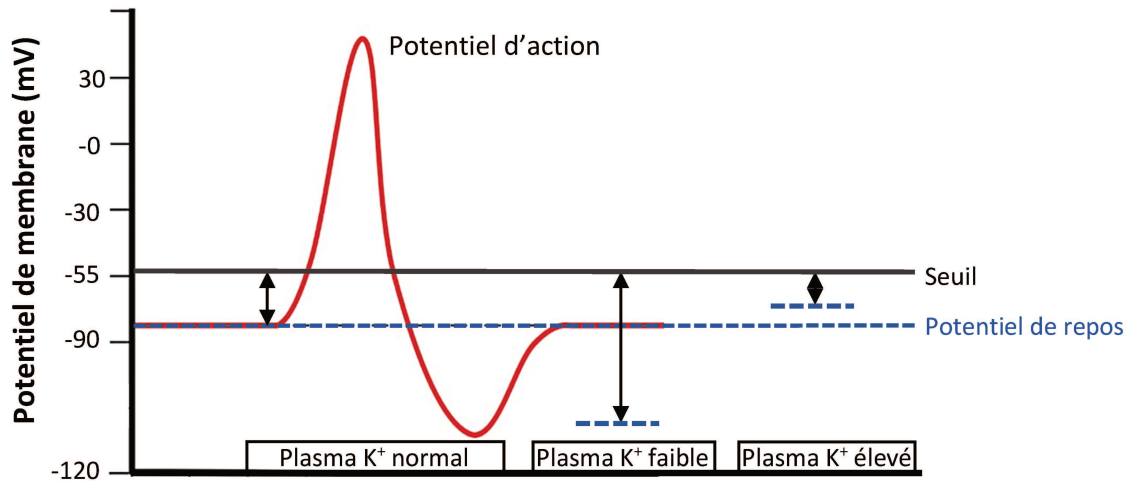


**Figure 6** : Représentation schématique des types cellulaires et des transports ioniques présents dans le tubule collecteur et canal collecteur. CP : Cellules principales, ICA : Cellule intercalaire de type A, ICB : Cellule intercalaire de type B.

### III. Homéostasie du potassium

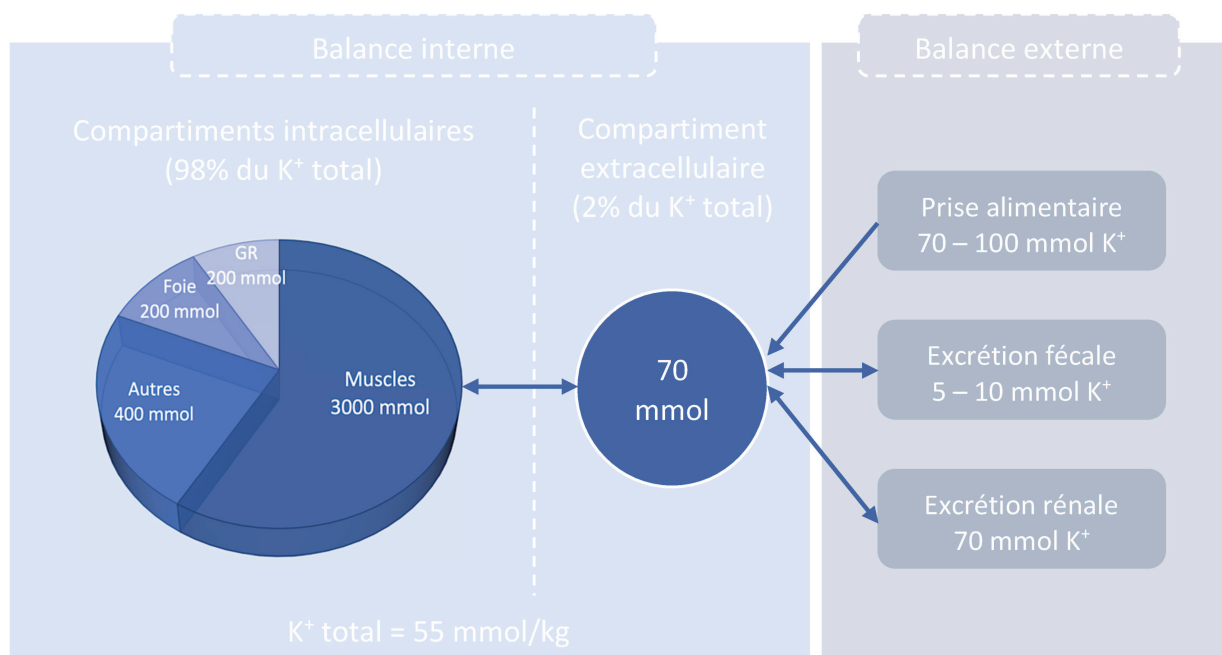
Le potassium ( $\text{K}^+$ ) est le cation le plus abondant présent dans notre organisme, il est essentiel à de nombreuses fonctions physiologiques, comme la régulation du volume cellulaire, le maintien du potentiel de repos membranaire, l'activité cardiaque et neuromusculaire. La teneur totale du corps en  $\text{K}^+$  est maintenue constante autour de 50 à 55 mmol/kg de poids corporel. Environ 98% du  $\text{K}^+$  présent dans l'organisme est intracellulaire dont 80% sont stockés dans les muscles squelettiques. Seulement 2% du  $\text{K}^+$  de notre organisme est extracellulaire. Il est le constituant principal de nos cellules avec une concentration de 120 mmol/L. Dans les liquides extracellulaires, sa concentration est d'environ 4 mmol/L. Ce gradient ionique ( $[\text{K}^+]_{\text{intracellulaire}} > [\text{K}^+]_{\text{extracellulaire}}$ ) est généré par la pompe  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase présente à la membrane plasmique de toutes les cellules. Il permet le maintien du potentiel de membrane, nécessaire à l'activation des cellules nerveuses et musculaires. Un excès de  $\text{K}^+$  dans les fluides extracellulaires diminue le potentiel de membrane. À l'inverse, une carence en  $\text{K}^+$  induit une hyperpolarisation de la membrane [voir **Figure 7**]. Ainsi, la concentration de  $\text{K}^+$  dans notre sang, appelée kaliémie, doit être maintenue dans des limites physiologiques très étroites entre 3,5 mmol/L – 5 mmol/L, quels que soient les apports quotidiens. Lorsque la valeur plasmatique

de  $K^+$  est au-dessus de 5mmol/L, nous parlons d'hyperkaliémie. À l'inverse, lorsqu'elle est en dessous de 3,5mmol/L, nous parlons d'hypokaliémie. Ces deux conditions sont pathologiques, et le reflet d'un déséquilibre dans l'homéostasie du potassium, provoquant l'apparition de troubles musculaires et/ou neurologiques pouvant aller jusqu'au décès.



**Figure 7 :** Les effets de la variation de la concentration plasmatique de potassium sur le potentiel de repos membranaire d'une cellule excitable. Une concentration de potassium ( $K^+$ ) plasmatique élevée rend le potentiel de repos membranaire moins négatif et diminue l'excitabilité en inactivant les canaux sodium responsables de la phase dépolarisante du potentiel d'action. Une valeur plasmatique de potassium faible hyperpolarise le potentiel de repos membranaire et réduit ainsi l'excitabilité car un stimulus plus important est nécessaire pour induire une dépolarisation et atteindre le seuil d'excitation.

Afin de maintenir un équilibre constant de la kaliémie, notre organisme met en place une régulation coordonnée entre les mécanismes de stockage/libération des réserves de  $K^+$  (balance interne) et les mécanismes de rétention/excrétion de  $K^+$  (balance externe) [voir **Figure 8**].



**Figure 8 : Représentation schématique de l'homéostasie du potassium.** Notre organisme est constitué en moyenne de 55 mmol/kg de poids corporel de  $K^+$ . 98% du  $K^+$  est intracellulaire, les 2% restant sont extracellulaires. L'organisme a pour objectif de maintenir la concentration en  $K^+$  extracellulaire (kaliémie) dans des valeurs physiologiques étroites. Pour cela, le  $K^+$  peut être absorbé ou libéré des compartiments intracellulaires (balance interne) d'une part, et réabsorbé ou excrété par les reins et l'intestin, d'autre part (balance externe). **GR** : Globules rouges.

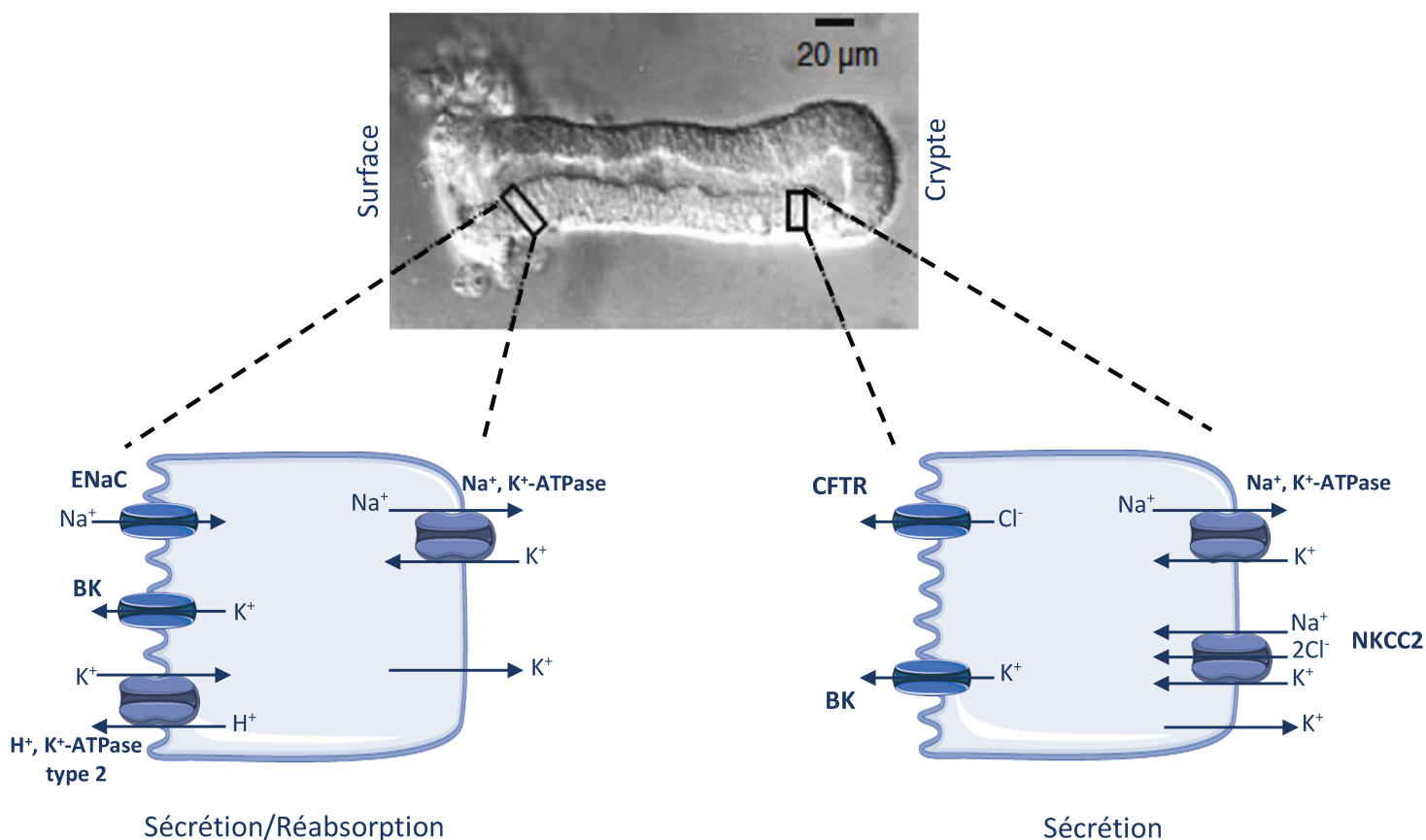
## 1. La balance interne de l'homéostasie potassique

La notion de balance interne fait référence aux mouvements de  $K^+$  entre le fluide intracellulaire et le fluide extracellulaire. Les compartiments de stockage intracellulaires de  $K^+$  peuvent réabsorber ou libérer du  $K^+$  dans l'espace extracellulaire de manière rapide. Alors que la libération de  $K^+$  dans l'espace extracellulaire est un processus passif se faisant via les canaux et transporteurs, le stockage de  $K^+$  dans les cellules musculaires est actif, et médié par la pompe  $Na^+,K^+$ -ATPase. L'acteur majeur de la balance interne de l'homéostasie potassique est le muscle. Cependant, le  $K^+$  est aussi stocké dans les globules rouges, le foie, et les os.

Ce faisant, les facteurs de régulation comme les hormones thyroïdiennes, l'insuline, l'exercice, modifient la quantité de  $Na^+,K^+$ -ATPase à la membrane des cellules musculaires et ont un impact direct sur la concentration de  $K^+$  extracellulaire en modifiant l'entrée de  $K^+$  dans les cellules. Un repas induit un apport d'énergie par le glucose, mais aussi un apport important de  $K^+$  présent dans les viandes, fruits et légumes. Les organismes vivants ont sélectionné le même mécanisme de régulation, qui implique principalement l'insuline, pour évacuer le glucose et le  $K^+$  du plasma afin d'éviter les conséquences néfastes de l'augmentation de leur concentration plasmatique. En effet, l'insuline agit sur les cellules du muscle squelettique en augmentant l'expression des transporteurs de glucose (glut-4) et de  $K^+$  ( $Na^+,K^+$ -ATPase). Pendant la période de jeûne, les apports en  $K^+$  étant faibles, la réserve intracellulaire de  $K^+$  est lentement libérée dans le compartiment plasmatique permettant ainsi à l'organisme de maintenir une kaliémie constante (Youn and McDonough, 2009). L'inhibition de la sécrétion d'insuline par un agoniste de la somatostatine empêche le stockage du  $K^+$  et provoque alors une hyperkaliémie (Sargent and Deppe, 1994). Le système nerveux sympathique joue aussi un rôle dans la balance du  $K^+$  intracellulaire et extracellulaire. En effet, les catécholamines impactent la distribution du  $K^+$  par l'activation des récepteurs adrénergiques  $\alpha$  et  $\beta_2$ . La stimulation des récepteurs de type  $\alpha$  induit une libération du  $K^+$  depuis les cellules vers le compartiment extracellulaire, alors que la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques induit un stockage du  $K^+$  dans les cellules. L'activation des récepteurs de type  $\beta_2$  est particulièrement importante à la suite d'un effort physique important, qui induit la libération de  $K^+$  dans le compartiment extracellulaire, afin d'éviter l'hyperkaliémie (Taal, Brenner and Rector, 2012)

## 2. Balance externe de l'homéostasie potassique : l'excrétion intestinale de potassium

La notion de balance externe fait référence aux mouvements de  $K^+$  entrant et sortant de l'organisme. Le côlon participe à l'homéostasie potassique par sa capacité à réabsorber ou sécréter du  $K^+$  selon les apports journaliers (Sorensen *et al.*, 2010; Rajendran and Sandle, 2018). Dans des conditions physiologiques, seulement 10% des apports en  $K^+$  sont excrétés dans les fèces, ce qui semble négligeable face à l'excrétion rénale de  $K^+$ . Cependant, lors d'une insuffisance rénale, la part d'excrétion de  $K^+$  par le côlon devient plus importante (Martin *et al.*, 1986). Il est intéressant d'observer que selon la position des cellules du côlon (colonocytes), les transporteurs exprimés et donc leur capacité de réabsorption et de sécrétion sont différentes. À la surface des villosités, les colonocytes réabsorbent le  $K^+$  par la pompe  $H^+,K^+$ -ATPase de type 2 (HKA2) qui est exprimée au pôle apical des cellules. La HKA2 est un transporteur électroneutre composé de deux sous-unités ; une sous-unité catalytique  $\alpha$  (codée par le gène *Atp12a*) associée à une sous-unité  $\beta$  (codé par le gène *Atp1b1* dans le côlon (Burnay *et al.*, 2001; Scudieri *et al.*, 2018)). L'absence de la pompe HKA2 induit une perte fécale de  $K^+$  (Meneton *et al.*, 1998). Que ce soit à la surface des villosités ou au niveau des cryptes, les colonocytes sont capables de sécréter du  $K^+$ . Dans les deux cas, l'entrée du  $K^+$  dans la cellule est médiée au pôle basolatéral par la pompe  $Na^+, K^+$ -ATPase (et le co-transporteur  $Na^+-K^+-2Cl^-$ , NKCC1 au niveau des cryptes). Le  $K^+$  est sécrété ensuite vers la lumière via les canaux  $K^+$  BK au pôle apical [voir **Figure 9**]. Cette voie de sécrétion est régulée par l'aldostérone qui stimule l'expression de la  $Na^+, K^+$ -ATPase et des canaux  $K^+$  (Foster, Hayslett and Binder, 1984; Sørensen *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012). Dans le côlon, l'aldostérone stimule également l'expression des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  du canal sodique épithélial ENaC, mais pas la sous-unité  $\alpha$  (Lingueglia *et al.*, 1994; Asher *et al.*, 1996; Epple *et al.*, 2000; Bertog *et al.*, 2008). Contrairement à son rôle majeur dans l'excrétion rénale de  $K^+$  dans le rein, ENaC n'est pas un acteur majeur de la sécrétion de  $K^+$  par le côlon. Il a été observé que le processus de sécrétion de  $K^+$  par le colon n'est pas altéré par l'administration d'un inhibiteur du canal ENaC, l'amiloride (Edmonds, 1981; Rechkemmer and Halm, 1989). De plus, ce processus n'est pas non plus altéré chez les souris délétées du gène codant la protéine ENaC (Malsure *et al.*, 2014).



**Figure 9** : Représentation schématique du transport de potassium au niveau du colonocyte. Processus de sécrétion et réabsorption par les colonocytes selon leur localisation. Les colonocytes présents au niveau de la crypte sont capables de sécréter du  $K^+$  alors que les colonocytes présents au niveau de la surface des villosités sont capables de sécréter et réabsorber du  $K^+$  grâce à l'expression de la HKA2.

### 3. Balance externe de l'homéostasie potassique : l'excrétion rénale de potassium

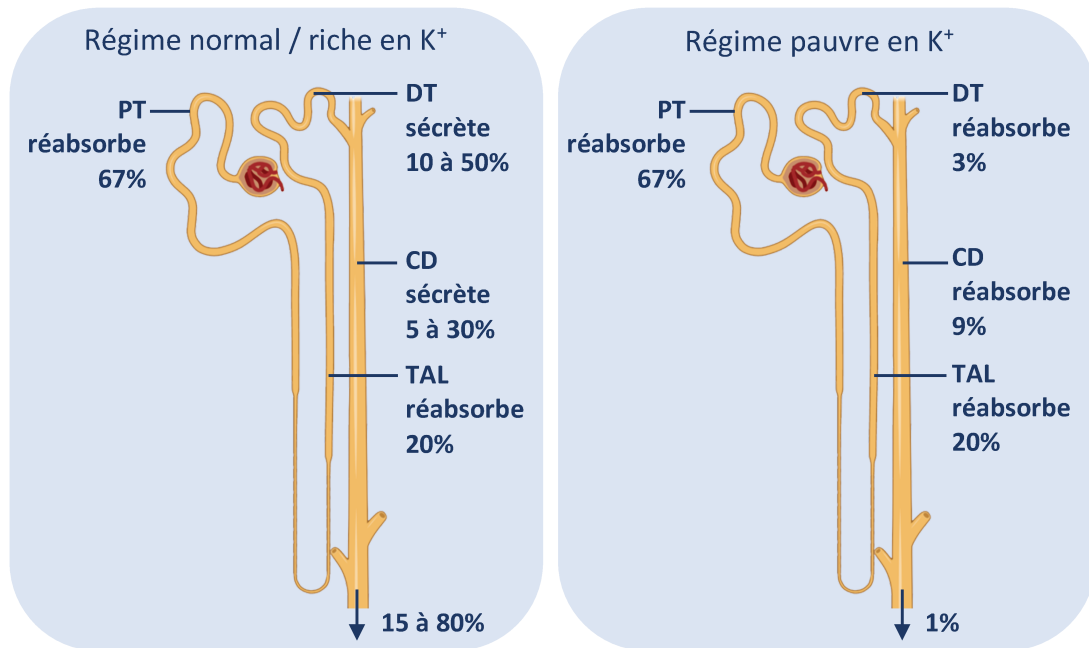
Le rein est l'acteur majeur de la balance externe du  $K^+$ . Il joue un rôle essentiel dans le maintien de la kaliémie. Pour cela, son excrétion urinaire doit être égale aux apports journaliers. L'excrétion rénale de  $K^+$  se fait à la suite de la filtration glomérulaire et durant le transport du  $K^+$  le long du tubule rénal. En conditions physiologiques, et lors d'un régime normal, le tubule proximal réabsorbe 67% du  $K^+$  filtré. Les segments S1 et S2 du tubule proximal réabsorbent du  $K^+$  alors que le dernier segment S3 sécrète du  $K^+$ . La sécrétion de  $K^+$  le long du segment S3 se fait par diffusion *via* la voie paracellulaire (Jamison, 1987). La réabsorption de  $K^+$  est majoritairement paracellulaire et suit la réabsorption des fluides, du  $Na^+$  et des autres solutés. (Kaufman and Hamburger, 1985; Bomsztyk and Wright, 1986). Bien que l'excrétion rénale de  $K^+$  soit constante au niveau du tubule proximal, des changements dans la réabsorption du  $Na^+$  et  $Cl^-$  dans cette zone du néphron modifient le flux tubulaire et l'apport de  $Na^+$  au niveau du



néphron distal, impactant l'excrétion de  $K^+$ . Les mécanismes permettant une réabsorption de  $K^+$  transépithéliale sont encore peu clairs et ce moyen de réabsorption ne semble pas jouer un rôle majeur (Kaufman and Hamburger, 1985). Environ 20% du  $K^+$  filtré est réabsorbé au niveau de l'anse de Henle. Les cellules de la branche large ascendante de l'anse de Henle, expriment à leur membrane apicale un co-transporteur  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$ , NKCC2, qui permet la réabsorption de  $K^+$ ,  $Cl^-$  couplé au  $Na^+$  ainsi qu'un canal potassique ROMK. À leur membrane basolatérale on retrouve une pompe  $Na^+$ ,  $K^+$  - ATPase, des canaux  $K^+$  et  $Cl^-$ . Ces différents transporteurs permettent la réabsorption massive de NaCl, qui induit une dépolarisation de la membrane basolatérale (due à la diffusion électrogénique de  $Cl^-$ ) et une hyperpolarisation de la membrane apicale (due à la diffusion électrogénique de  $K^+$ ). Cela crée un voltage transépithéliale lumière-positive qui induit une réabsorption passive de  $Na^+$  et  $K^+$  par la voie paracellulaire. La majorité des ions  $K^+$  accumulés dans les cellules *via* NKCC2 sont recyclés par la membrane apicale contribuant à la réabsorption de NaCl (Greger, 1985).

L'anse de Henle joue un rôle essentiel dans le recyclage du  $K^+$  médullaire. Il a été démontré qu'une fraction du  $K^+$  sécrété par les canaux collecteurs corticaux est réabsorbée par les canaux collecteurs médullaires (et par la branche ascendante large de l'anse de Henle) puis sécrétée au niveau des branches grêles descendantes de l'anse de Henle, provoquant une accumulation de  $K^+$  dans l'interstitium médullaire. Cette accumulation du  $K^+$ , par recyclage, permet l'augmentation du flux tubulaire et l'arrivée de  $Na^+$  au niveau du néphron distal favorisant ainsi la sécrétion de  $K^+$  à ce niveau (Stokes, 1982).

Au niveau du tubule proximal et de l'anse de Henle, le pourcentage de  $K^+$  réabsorbé reste constant. Le néphron distal (tubule contourné distal, tubule connecteur) et le canal collecteur sont capables de réabsorber, mais aussi de sécréter du  $K^+$ . Dans cette zone du néphron, le pourcentage de réabsorption et de sécrétion de  $K^+$  est modulé par des facteurs et hormones de régulations. Un apport riche en  $K^+$  induit une augmentation de la sécrétion et une inhibition de la réabsorption de  $K^+$ . À l'inverse, un apport faible en  $K^+$  induit une augmentation de la réabsorption et une inhibition de la sécrétion de  $K^+$  [voir **Figure 10**]. Dans cette zone du néphron, ce sont les cellules du tubule contourné distal, les cellules principales et les cellules intercalaires de type A qui interviennent dans la sécrétion et la réabsorption de  $K^+$ .



**Figure 10** : Transport de potassium le long du néphron. L'excrétion finale de  $K^+$  dépend de la quantité de  $K^+$  réabsorbé ou sécrété au niveau du néphron distal et du canal collecteur. Les pourcentages correspondent à la quantité de  $K^+$  filtré réabsorbé ou sécrété. A gauche, 15 à 80% du  $K^+$  filtré est excrété lors d'un régime normal ou riche en  $K^+$ . A droite, 1% du  $K^+$  filtré est excrété lors d'une restriction potassique. PT : Tubule proximal. TAL : Branche large ascendante de Henle. DT : néphron distal. CD : Canal collecteur.

#### a. Homéostasie du $K^+$ au niveau du tubule contourné distal

Le tubule contourné distal (DCT) est un senseur de  $K^+$  qui, bien qu'il ne contribue pas directement à la sécrétion et à la réabsorption du  $K^+$ , contrôle l'arrivée de  $Na^+$  aux segments suivants qui sécrètent du  $K^+$  de manière  $Na^+$ -dépendante *via* la modulation du co-transporteur NCC. Pour rappel, le DCT est constitué d'une partie proximale appelée DCT1 et d'une partie distale appelée DCT2. La prise d'un repas induit une augmentation de la concentration plasmatique de  $K^+$  qui engendre l'inhibition du co-transporteur NCC. Cette inhibition de la réabsorption de  $Na^+$  par NCC induit une augmentation du flux et de l'arrivée de  $Na^+$  au niveau du DCT2 et du canal collecteur. En parallèle, l'augmentation de la concentration plasmatique de  $K^+$  stimule la synthèse d'aldostérone qui stimule la sécrétion de  $K^+$  via le canal potassique ROMK. L'augmentation du flux et la synthèse d'aldostérone favorisent également la sécrétion de  $K^+$  via le canal potassique BK (Michael J Field, Stanton and Giebisch, 1984; McCormick and Ellison, 2018). Il a été démontré dans la littérature, que l'augmentation de la kaliémie induit une dépolarisation des cellules du DCT1, conduisant à une élévation du  $Cl^-$  intracellulaire. Cette élévation du  $Cl^-$  intracellulaire inhibe l'activité de WNK4 diminuant l'activité de SPAK provoquant une diminution de l'activité de NCC (Bazúa-Valenti *et al.*, 2014). À l'inverse, lors d'une carence potassique, NCC est activé permettant de limiter l'arrivée de  $Na^+$  au niveau du DCT2 et du canal collecteur inhibant la sécrétion de  $K^+$ . Lors d'un régime faible en  $K^+$ , la

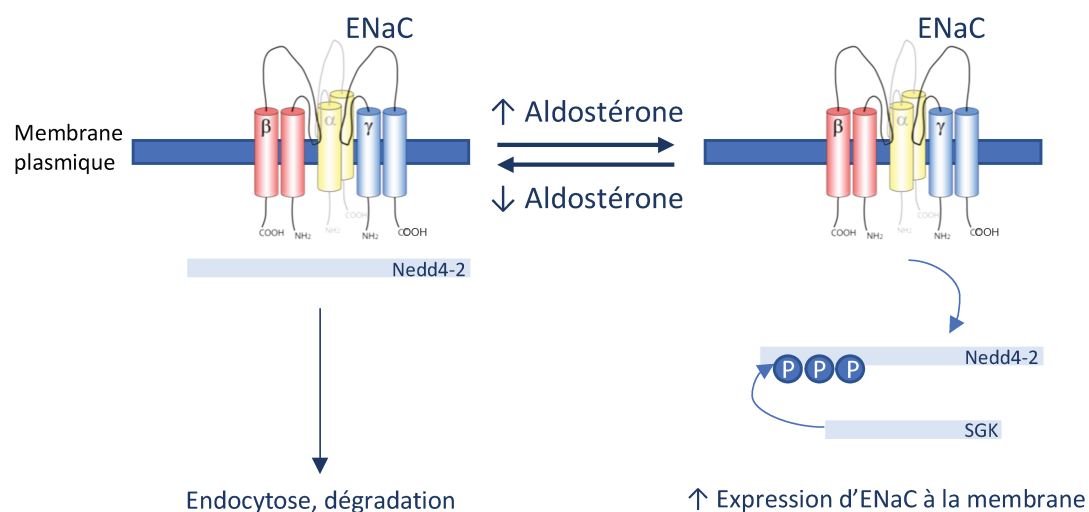
concentration en  $K^+$  extracellulaire est inférieure à la concentration  $K^+$  intracellulaire créant un gradient électrochimique favorable à la sortie de  $K^+$  par le canal potassique Kir 4.1/Kir 5.1 (Wang, 2017). Cette sortie de  $K^+$  induit une hyperpolarisation de la membrane plasmique et donc l'ouverture des canaux  $Cl^-$ . Le  $Cl^-$  intracellulaire diminue, induisant une levée d'inhibition de WNK4 qui active à son tour SPAK engendrant une activation de NCC (Bazúa-Valenti *et al.*, 2014). De plus, un régime faible en  $K^+$  induit une prolifération des cellules du DCT (Saritas *et al.*, 2019).

#### *b. Les mécanismes cellulaires du transport de $K^+$ par les cellules principales*

Le mécanisme de sécrétion de  $K^+$  au niveau des cellules principales du sang vers la lumière tubulaire se fait en deux temps. (1) Le  $K^+$  passe du sang vers le compartiment intracellulaire *via* la pompe  $Na^+,K^+$ -ATPase présente à la membrane basolatérale. (2) Le  $K^+$  est sécrété du compartiment intracellulaire vers la lumière tubulaire par diffusion *via* les canaux potassiques ROMK, BK et le symport  $K^+, 2Cl^-$ , KCC1 présents à la membrane apicale. La pompe  $Na^+,K^+$ -ATPase permet de créer un gradient électrochimique favorable à la sortie apicale de  $K^+$ . De plus, l'entrée apicale de  $Na^+$  via le canal ENaC permet la génération d'un gradient électrochimique lumière-négatif favorisant aussi la sécrétion apicale de  $K^+$  via les canaux potassiques [Figure 6] (Palmer, 2015; Pearce *et al.*, 2015).

#### **Modulations de la sécrétion de potassium par les cellules principales**

**L'aldostérone** est un facteur de régulation important qui stimule la sécrétion de  $K^+$ . Sa production est stimulée par une élévation de la kaliémie qui peut faire suite, entre autres, à une charge orale de  $K^+$  (Palmer and Clegg, 2022). Elle n'agit pas directement sur les canaux potassiques mais induit une stimulation du canal ENaC et donc favorise la création du gradient électrochimique favorable à la sécrétion de  $K^+$ . L'aldostérone induit une augmentation du canal ENaC par différents mécanismes. Tout d'abord, elle stimule l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du canal, favorisant l'assemblage du canal avec les sous-unité abondantes  $\beta$  et  $\gamma$  (Mick *et al.*, 2001). Elle induit également la translocation d'ENaC du compartiment cytoplasmique à la membrane apicale (Loffing *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'aldostérone stimule la production de la serine-thréonine kinase SGK1 qui favorise la l'expression du canal ENaC à la membrane apicale (Náray-Fejes-Tóth *et al.*, 1999). SGK1 agit en inhibant l'ubiquitination, et donc la dégradation, par l'ubiquitine ligase Nedd4-2 du canal ENaC (Snyder, Olson and Thomas, 2002)[voir Figure 11].



**Figure 11** : Mécanismes de régulation du canal ENaC par l'aldostérone via la kinase SGK et l'ubiquitine ligase Nedd4-2. En absence d'aldostérone, Nedd4-2 se lie au canal ENaC et l'ubiquitine induisant une endocytose puis une dégradation du canal. En présence d'aldostérone, il y a synthèse de la kinase SGK qui phosphoryle Nedd4-2, empêchant la dégradation d'ENaC, favorisant son expression à la membrane plasmique.

Enfin, l'aldostérone stimule le canal ENaC par l'induction de protéases activatrices de canaux CAP 1, 2 et 3. Ces protéases sont capables d'exciser des domaines précis du canal augmentant sa probabilité d'ouverture (Kleyman, Carattino and Hughey, 2009). L'aldostérone induit aussi une stimulation de la pompe Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase à la membrane basolatérale (Petty, Kokko and Marver, 1981; Mernissi and Doucet, 1983; Mujais *et al.*, 1984).

**La prise orale de K<sup>+</sup>** module également la sécrétion de K<sup>+</sup>, indépendamment de la synthèse d'aldostérone, par la stimulation directe du canal ENaC et des canaux potassiques (Palmer and Frindt, 1999). Une charge orale de K<sup>+</sup> induit la stimulation des canaux BK, de manière indépendante de l'aldostérone (Najjar *et al.*, 2005; Estilo *et al.*, 2008). Le canal potassique ROMK est aussi stimulé dans ces conditions. En effet, une charge orale potassique induit une diminution de la forme longue de la kinase sans lysine 1 WNK1-L en faveur de l'augmentation de sa forme tronquée WNK1-S. L'élévation de WNK1-S induit une inhibition de WNK1-L et donc une inhibition de l'endocytose de ROMK (Subramanya *et al.*, 2006).

**Le flux tubulaire** est également impliqué dans la régulation de la sécrétion de K<sup>+</sup>. Un flux important induit une arrivée importante de Na<sup>+</sup> dont la réabsorption via ENaC va favoriser la sécrétion de K<sup>+</sup> *via* le canal potassique BK (Muto, 2001). Le flux tubulaire augmente notamment lors d'un régime riche en K<sup>+</sup>. Il a également été démontré que l'augmentation du flux tubulaire stimule mécaniquement le cil présent à la membrane apicale des cellules principales. Cette stimulation provoque une élévation de la concentration intracellulaire de Cl<sup>-</sup>

dans ces dernières, induisant l'activation de la sécrétion de  $K^+$  *via* les canaux potassique BK (Liu *et al.*, 2009; Carrisoza-Gaytan *et al.*, 2016).

**La vasopressine (AVP)** est aussi un modulateur de la sécrétion de  $K^+$ . L'activation par la vasopressine permet de préserver la sécrétion de  $K^+$  lorsque l'apport tubulaire de  $Na^+$  est réduit. L'AVP agit *via* le récepteur V2 présent au niveau des cellules principales, et stimule le canal ENaC, la réabsorption de  $Na^+$  et donc la sécrétion de  $K^+$  (Michael J. Field, Stanton and Giebisch, 1984; Elalouf, Roinel and de Rouffignac, 1985). De plus, la vasopressine active aussi les canaux potassiques BK et ROMK (Cassola, Giebisch and Wang, 1993; Amorim *et al.*, 2004).

**La kallikréine** est une hormone, sécrétée au niveau du tubule connecteur suite à un repas qui favorise la sécrétion de  $K^+$  par la stimulation du canal ENaC (Patel, Chao and Palmer, 2012).

*c. Les mécanismes cellulaires du transport de  $K^+$  par les cellules intercalaires de type A*

Les cellules intercalaires de type A permettent la réabsorption de  $K^+$  *via* la pompe HKA2 présente à la membrane apicale et faiblement exprimée dans des conditions normales. La HKA2, aussi appelée  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase colonique ou non gastrique, appartient à la famille des ATPase de type P et est composée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et est sensible à la ouabaïne (Crambert, 2014, p. 2). La pompe permet de réabsorber un ion  $K^+$  de la lumière tubulaire vers le compartiment intracellulaire en échange de la sécrétion d'un proton. Le passage du  $K^+$  du compartiment intracellulaire vers le sang se fait *via* un canal potassique, dont la nature reste à déterminer. Les cellules intercalaires de type A possèdent aussi à la membrane apicale un canal potassique BK qui permet la sécrétion de  $K^+$  (Taal, Brenner and Rector, 2012)[voir **Figure 6**].

*Modulations de la réabsorption de potassium par les cellules intercalaires de type A*

**La restriction potassique** stimule la réabsorption de  $K^+$  par les cellules intercalaires de type A (Malnic, Klose and Giebisch, 1964; Roy, Al-bataineh and Pastor-Soler, 2015). Il a été démontré que, dans ce contexte, il y avait une synthèse de progestérone responsable de la stimulation de la HKA2 (Hayashi and Katz, 1987; Elabida *et al.*, 2011). La restriction potassique stimule aussi l'augmentation du nombre de cellules intercalaires de type A afin d'augmenter la surface de réabsorption du  $K^+$  (Iervolino *et al.*, 2020). Les facteurs de croissance IGF-1 et GDF15 seraient impliqués dans le signal induisant l'augmentation du nombre de cellules intercalaires de type A (Doucet and Crambert, 2015). Cependant, il n'a pas encore été clairement défini s'il s'agissait d'une transdifférenciation des cellules principales en cellules intercalaires de type A, ou une entrée en prolifération de ces dernières (Cheval *et al.*, 2004; Iervolino *et al.*, 2020).

**La kallikréine**, en plus de stimuler la sécrétion de  $K^+$  par les cellules principales, inhibe la réabsorption de  $K^+$  au niveau des cellules intercalaires de type A *via* l'inhibition de la HKA2 (El Moghrabi *et al.*, 2010)

#### 4. L'hyperkaliémie

##### a. Épidémiologie

L'hyperkaliémie est définie comme une valeur de  $K^+$  plasmatique supérieure à 5,5mmol/L. Elle concerne jusqu'à 10% des patients hospitalisés. Cette condition est multifactorielle (baisse de la fonction rénale, traitements, âge >60 ans, hyperglycémie) et est associée à une augmentation du taux de mortalité chez les patients hospitalisés (Acker *et al.*, 1998). Le risque de développer une hyperkaliémie est supérieur chez les hommes atteints d'une maladie rénale chronique (Moranne *et al.*, 2009). Cependant, le risque de décès lié à l'hyperkaliémie n'augmente pas au cours de l'évolution de la maladie rénale chronique. Ceci serait peut-être dû à la mise en place d'un mécanisme d'adaptation à l'hyperkaliémie chronique encore non élucidée (Einhorn *et al.*, 2009).

##### b. Conséquences d'une hyperkaliémie

###### Conséquences cardiaques et musculaires de l'hyperkaliémie

L'hyperkaliémie peut engendrer le pronostic vital des patients, de par son effet sur le cœur. En effet, elle induit une dépolarisation des cardiomyocytes, réduisant leur potentiel de membrane. L'hyperkaliémie peut donc induire des troubles du rythme (arythmie) et de la conduction cardiaque (Mattu, Brady and Robinson, 2000). Dans certains cas, une hyperkaliémie peut aussi induire une paralysie musculaire pouvant aller jusqu'à l'atteinte du diaphragme (Freeman and Fale, 1993).

###### Conséquences rénales de l'hyperkaliémie

L'hyperkaliémie impacte l'excrétion urinaire d'acide, car elle interfère avec la réabsorption d'ammonium ( $NH_4^+$ ). Suite à une charge en ammonium, une charge en  $K^+$  induit une réduction de l'excrétion urinaire de  $NH_4^+$ , altérant donc la réponse à une charge acide chez l'homme (Tannen, Wedell and Moore, 1973). La branche ascendante large de Henle est le site majeur de réabsorption de  $NH_4^+$  dans le néphron. Cela se fait *via* le co-transporteur apical NKCC2 qui substitue le transport de  $K^+$  par des ions  $NH_4^+$ . Cependant, lors d'une hyperkaliémie, le  $K^+$  en excès rentre en compétition et inhibe la réabsorption de  $NH_4^+$  *via* NKCC2. Il y a donc moins d'ions  $NH_4^+$  qui diffusent jusqu'au canal collecteur *via* les protéines RhCG et RhBG (DuBose and Good, 1992). On observe, chez les patients atteints d'une acidose métabolique avec hyperkaliémie, une augmentation de l'excrétion urinaire de  $NH_4^+$  lorsque l'hyperkaliémie est

corrigée. L'hyperkaliémie possède donc un rôle non négligeable dans le développement d'acidose métabolique (Matsuda *et al.*, 1988).

### *c. Origines de l'hyperkaliémie*

**La prise orale importante de potassium** est normalement bien excrétée par le rein. Cependant, elle peut provoquer une hyperkaliémie chez les patients présentant des facteurs de risques comme l'insuffisance rénale, le diabète et les patients sous diurétiques épargneurs de  $K^+$ , par exemple (Hunter and Bailey, 2019). Plus rarement, la consommation de boissons énergétiques peut aussi provoquer des hyperkaliémies sévères chez des personnes sans prédispositions particulières (Parisi *et al.*, 2002). Une autre source d'hyperkaliémie dans ce contexte peut être le surdosage de supplémentation en KCl lors du traitement d'une hypokaliémie (Crop *et al.*, 2007).

**La transfusion de sang** est également une cause d'hyperkaliémie. L'ancienneté du sang perfusé est un facteur de risque, la concentration de  $K^+$  augmentant avec le temps passant d'environ 23 mmol/L à 50 mmol/L à 7 et 42 jours respectivement (Baz *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2008).

L'hyperkaliémie peut aussi subvenir suite à **une rhabdomyolyse**, le muscle étant un compartiment de stockage majeur du  $K^+$ . Une déplétion volémique, les médicaments et les prédispositions métaboliques sont des facteurs pouvant provoquer une rhabdomyolyse. Une rhabdomyolyse mécanique suite à un traumatisme peut aussi induire une hyperkaliémie (ex : « crush-syndrome ») (Sever and Vanholder, 2011).

**Une diminution de l'excrétion rénale de  $K^+$**  peut aussi être source d'hyperkaliémie. L'aldostérone permet la sécrétion rénale de  $K^+$ , cependant certaines pathologies peuvent comprendre une baisse de la synthèse d'aldostérone (hypoaldostéronisme). L'hypoaldostéronisme peut être provoqué par des médicaments, ou un défaut de synthèse d'hormones stimulant la synthèse d'aldostérone par les glandes surrénales comme la rénine ou l'ACTH (Rajkumar and Waseem, 2022). Une perte de fonction du récepteur minéralocorticoïde peut également en être la cause, comme dans le cas d'un pseudohypoaldostéronisme de type 1 (Amin *et al.*, 2013). La diminution de l'excrétion rénale de  $K^+$  peut aussi faire suite à une insuffisance rénale. Il a par ailleurs été démontré que le colon était capable d'essayer de compenser en augmentant sa capacité d'excrétion de  $K^+$  dans les fèces (Martin *et al.*, 1986).

**Les traitements médicamenteux** comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), des récepteurs minéralocorticoïdes ainsi que les antagonistes de l'angiotensine, pour le traitement des pathologies cardiaques et de l'hypertension, induisent une

réétention de  $K^+$  en diminuant la synthèse d'aldostérone, ou en empêchant son action (Weir and Rolfe, 2010). Le triméthoprim est un antibiotique à la structure similaire à l'amiloride, inhibiteur du canal  $Na^+$  ENaC. L'inhibition de réabsorption de  $Na^+$  diminue le gradient électrochimique favorable à la sécrétion de  $K^+$  par les cellules principales et donc une rétention de  $K^+$  pouvant induire une hyperkaliémie (Alappan, 1996). L'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs de la cyclooxygénase peuvent aussi provoquer des hyperkaliémies. En effet, ils diminuent le débit de filtration glomérulaire et l'apport de  $Na^+$  au niveau du néphron distal et du canal collecteur. Cela a un impact sur les canaux potassiques qui permettent la sécrétion de  $K^+$  (BK) en réponse au flux et la sécrétion de  $K^+$  dans les cellules principales favorisée par la réabsorption de  $Na^+$  (Harris, 2002). L'inhibition de la sécrétion d'insuline, par les agonistes de la somatostatine, peut causer des hyperkaliémies par l'absence de stimulation de la  $Na^+,K^+$ -ATPase musculaire qui permet le stockage du  $K^+$  (Sargent and Deppe, 1994).

## 5. L'hypokaliémie

### *Épidémiologie*

L'hypokaliémie est une pathologie commune, concernant 20% des patients hospitalisés. Elle est définie par une valeur plasmatique inférieure à 3,5 mmol/L, et elle est considérée comme sévère lorsque la kaliémie est inférieure à 3 mmol/L (Paltiel *et al.*, 2001). La cause la plus courante de l'hypokaliémie est la perte gastro-intestinale de  $K^+$  (diarrhées), l'administration de traitements diurétiques et l'hypomagnésémie (Crop *et al.*, 2007). Le diurétique thiazidique, métolazone, provoque une hypokaliémie modérée à sévère chez 40 et 10% des patients, respectivement (Rosenberg *et al.*, 2005). L'hypokaliémie est aussi fréquente chez les patients sous dialyse péritonéale, 10 à 20% d'entre eux nécessitant une supplémentation en  $K^+$  (Tziviskou *et al.*, 2003). En raison de ses effets sur le rythme cardiaque et la pression artérielle, l'hypokaliémie peut multiplier par 10 le taux de mortalité des patients hospitalisés (Paltiel *et al.*, 2001).

### *a) Conséquences d'une hypokaliémie*

#### **Conséquences cardiaques et musculaires de l'hypokaliémie**

Tout comme pour l'hyperkaliémie, l'hypokaliémie est décrite comme étant un facteur de risque de développement d'arythmies (Cohen *et al.*, 1987). Pour exemple, il a été démontré que chez les patients subissant une chirurgie cardiaque, une kaliémie inférieure à 3,5 mmol/L est prédicteur de développements d'arythmies cardiaques pendant et après l'opération (Wahr *et al.*, 1999). Au niveau musculaire, l'hypokaliémie induit une hyperpolarisation perturbant les capacités de dépolarisations et donc de contractions du muscle [pour rappel, voir **Figure 7**].



Cette hyperpolarisation des cellules musculaires est reflétée par une fatigue musculaire pouvant aller jusqu'à la paralysie (Tang *et al.*, 1999).

#### Conséquences cardiovasculaires de l'hypokaliémie

De nombreuses études ont démontré l'implication d'une hypokaliémie et/ou d'un régime faible en  $K^+$  dans le développement de l'hypertension artérielle, de l'insuffisance cardiaque et d'accidents vasculaires cérébraux (Coca, Perazella and Buller, 2005). Une déplétion potassique chronique induit une rétention de NaCl associée à une hypertension sensible au sel qui persiste bien que les apports en  $K^+$  soient rétablis (Ray *et al.*, 2001; Mente *et al.*, 2014; Terker *et al.*, 2015). En effet, lors d'une hypokaliémie ou d'une restriction en  $K^+$ , les cellules principales arrêtent de sécréter du  $K^+$ , et cela passe par une inhibition du canal ENaC afin d'arrêter la génération du gradient électrochimique favorable à la sécrétion de  $K^+$ . Cependant, afin de compenser la perte de réabsorption de  $Na^+$  par ENaC, l'organisme stimule la réabsorption massive de  $Na^+$  via le co-transporteur NCC et cela même dans le cas d'un régime riche en sel (Terker *et al.*, 2015). La correction de l'hypokaliémie induite par les diurétiques est donc particulièrement importante chez les patients hypertendus, il a été démontré qu'une amélioration de la kaliémie induisait une amélioration de la pression artérielle (Kaplan *et al.*, 1985). Enfin, il a été démontré que l'hypokaliémie jouait un rôle important dans la progression de l'insuffisance cardiaque (Coca, Perazella and Buller, 2005).

#### Conséquences rénales de l'hypokaliémie

Les conséquences rénales majeures d'une hypokaliémie sont la rétention de NaCl, la polyurie, la phosphaturie, l'hypocitraturie ainsi qu'une augmentation de l'ammoniogenèse (Schwartz and Relman, 1967; Levi *et al.*, 1991; Giebisch, 2013). Tous les mécanismes induisant ces modifications en réponse à une hypokaliémie ne sont pas clairement élucidés. Concernant la rétention de NaCl, elle est due à une réabsorption massive de  $Na^+$  et  $Cl^-$  au niveau du tubule proximal, associée à une augmentation de l'échangeur  $Na^+/H^+$ , NHE3 (Elkjær *et al.*, 2002). La polyurie observée, quant à elle, est due à la polydipsie et à un défaut de concentration des urines (Berl *et al.*, 1977).

#### b) Les pertes extrarénales de potassium

La perte cutanée de  $K^+$ , en dehors d'un effort physique intensif, est généralement faible (Knochel, Dotin and Hamburger, 1972). En revanche, la perte gastro-intestinale de  $K^+$  provoquée par des diarrhées importantes est une cause non négligeable d'hypokaliémie, et peut être associée à des complications aiguës comme la paralysie musculaire. L'administration de polyéthylène glycol lors de colonoscopies peut aussi conduire à une hypokaliémie chez les

patients âgés (Ho, Juurlink and Cavalcanti, 2010). L'hypokaliémie peut aussi apparaître lors de la maladie cœliaque, l'iléostomie et l'abus chronique de laxatifs (Diekmann *et al.*, 2001).

### *c) Les pertes rénales de potassium*

#### Les drogues

**Les diurétiques** sont une cause importante de développement d'hypokaliémies par leur capacité à induire une arrivée importante de  $\text{Na}^+$  au niveau du néphron distal, stimulant ainsi la sécrétion de  $\text{K}^+$ . Les diurétiques thiazidiques provoquent généralement plus d'hypokaliémies que les diurétiques de l'anse, malgré leur effet natriurétique moindre (Kaplan *et al.*, 1985; Schnaper *et al.*, 1989). Une explication possible est l'effet des diurétiques de l'anse sur l'excrétion de calcium qui, à l'inverse des diurétiques thiazidiques, induisent une calciurèse importante (Bertog *et al.*, 2008). L'arrivée de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du néphron distal réduit la force motrice lumière-négative qui sert à l'excrétion de  $\text{K}^+$  (Okusa *et al.*, 1990; Taal, Brenner and Rector, 2012).

**L'acétaminophène** (paracétamol) peut aussi être à l'origine d'hypokaliémies, à de fortes doses, induisant une kaliurèse importante (Waring *et al.*, 2008).

**Les antibiotiques à base de pénicilline** peuvent aussi induire une hypokaliémie à de fortes doses, augmentant la sécrétion de  $\text{K}^+$  en agissant comme des anions non réabsorbables par le néphron (Ichai, 2010).

#### L'hyperaldostéronisme

L'hyperaldostéronisme se définit comme une élévation de la concentration d'aldostérone circulant due à une production excessive. Elle peut être primaire, dans ce cas la surproduction est due à une tumeur ou une hyperplasie des glandes surrénales. Elle peut également être secondaire, dans ce cas il y a une production accrue d'aldostérone par les surrénales en réponse à des stimuli non hypophysaires et extrarénaux, tels que l'hypoperfusion rénale. Dans les deux cas, la surproduction d'aldostérone favorise l'excrétion rénale accrue de  $\text{K}^+$  (Ichai, 2010).

**Les syndromes de Bartter et de Gitelman** sont deux tubulopathies héréditaires caractérisées par une anomalie de réabsorption de  $\text{NaCl}$  au niveau de l'anse et du tubule contourné distal, respectivement. Cette anomalie de réabsorption induit une légère déplétion volémique qui provoque alors l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone conduisant à l'élévation de l'aldostérone circulant et donc une perte de  $\text{K}^+$  urinaire (Blanchard, Courand, *et al.*, 2020).

#### Les pseudo-hyperaldostéronismes

Les pseudo-hyperaldostéronismes sont des conditions pathologiques qui miment des symptômes évocateurs d'une élévation du taux d'aldostérone circulant sans ce que soit le cas.

Une hypokaliémie par pseudo-hyperaldostéronisme fait souvent suite à une **consommation excessive de réglisse** (intoxication à la glycyrrhizine) (Eustache *et al.*, 2020).

**Un excès de glucocorticoïdes** par un apport exogène trop important de glucocorticoïdes ou dans le cadre de certaines pathologies peut provoquer des hypokaliémies sans que le taux d'aldostérone circulant ne soit modifié. Dans certains cas du syndrome de Cushing, l'excès de cortisol dépasse les capacités cataboliques de la 11 $\beta$ HSD2 (enzyme qui permet la spécificité de réponse du tubule contourné distal à l'aldostérone, voir **p11**) et stimule directement le récepteur minéralocorticoïde induisant, en partie, une hypokaliémie (White, 2001).

**Le syndrome de Liddle** est une maladie héréditaire avec une mutation activatrice du canal ENaC induisant une réabsorption excessive de Na<sup>+</sup>, mais surtout une sécrétion importante de K<sup>+</sup> responsable de l'hypokaliémie (Palmer and Alpern, 1998; Tabibzadeh and Crambert, 2022).

#### Des carences en magnésium

Une carence en magnésium peut être responsable du développement d'une hypokaliémie. En effet, la sécrétion de K<sup>+</sup> au niveau du néphron distal est stimulée dans ces conditions. Lorsque la concentration de Mg<sup>2+</sup> intracellulaire dans les cellules principales est diminuée suite à une hypomagnésémie, ROMK n'est plus inhibé et sécrète du K<sup>+</sup> (Yang, Frindt and Palmer, 2010).

## **IV. Objectifs**

L'objectif de cette thèse est de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes induits par l'organisme afin de maintenir une kaliémie stable. Nous nous sommes intéressés à deux situations particulières que sont la restriction potassique et la gestation. Ces deux situations, qui sont en apparence très différentes, partagent des mécanismes de conservation du K<sup>+</sup> similaires. Ainsi, dans les deux cas, la rétention de K<sup>+</sup> dépend de la stimulation de la HKA2 *via* un mécanisme impliquant la progestérone (Elabida *et al.*, 2011; Salhi *et al.*, 2013). Cependant, nous avons observé qu'en absence de la HKA2, les souris en restriction potassique développent une hypokaliémie (Meneton *et al.*, 1998; Walter *et al.*, 2016) alors que les souris gestantes maintiennent une kaliémie normale (Salhi *et al.*, 2013). Nous avons donc voulu comprendre les mécanismes impliqués dans ces deux contextes.

Pour rappel, la restriction potassique induit une prolifération des cellules intercalaires de type A, afin d'augmenter la surface de réabsorption rénale de K<sup>+</sup>, ainsi qu'une stimulation de la HKA2 qui permet de réabsorber le K<sup>+</sup>. Des données, non publiées par notre laboratoire, ont démontré que, dans le cadre d'une restriction potassique, l'absence de HKA2 empêche la prolifération des cellules intercalaires de type A. Nous avons donc décidé de nous intéresser

aux mécanismes induisant la prolifération de ces cellules. Des études transcriptomiques réalisées par notre laboratoire ont mis en évidence l'augmentation de l'expression du facteur de croissance GDF15 dans les canaux collecteurs de souris soumises à une restriction potassique. Nous avons donc cherché à mettre en évidence, dans une première étude, le rôle de GDF15 dans la régulation de la réabsorption rénale de  $K^+$  en réponse à une déplétion potassique.

Concernant la gestation, les souris gravides, invalidées pour la HKA2, présentent un défaut de rétention de  $K^+$ , mais leur kaliémie reste normale. Nous avons donc, dans une seconde étude, cherché à comprendre les mécanismes compensateurs mis en place lors de la gestation en absence de la HKA2.

La piste envisagée est que les souris gestantes contractent leur volume extracellulaire afin de maintenir leur kaliémie, ce qui a déjà été observé chez des souris HKA2<sup>-/-</sup> en restriction potassique (Walter *et al.*, 2016).

# **PREMIERE ETUDE : ADAPTATION A UNE RESTRICTION POTASSIQUE**

# I. Introduction

## 1. Généralités

Le régime occidental actuel est caractérisé par la consommation importante d'aliments transformés avec des apports importants en protéines, produits laitiers riches en graisses, boissons et aliments riches en sucre. Ce régime est corrélé au développement de troubles métaboliques comme le diabète et l'obésité. La consommation importante d'aliments transformés a également des conséquences importantes, souvent sous-estimées, sur l'équilibre électrolytique. En effet, avec ce type d'alimentation l'organisme produit environ 50 mmol d'acide par jour alors que l'organisme des ancêtres chasseurs-cueilleurs avait une production net de bases (Sebastian *et al.*, 2002). En parallèle, la consommation de NaCl et de K<sup>+</sup> a été complètement modifiée, passant d'un régime faible en NaCl et riche en K<sup>+</sup> dans la population des chasseurs-cueilleurs à un régime fort en NaCl et faible en K<sup>+</sup> dans la population occidentale actuelle (Meneton, Loffing and Warnock, 2004). Dans une étude récente, il a été démontré dans notre laboratoire que les apports moyens de Na<sup>+</sup> et de K<sup>+</sup> chez les jeunes hommes parisiens sont respectivement de 3,13g et 2,23g par jour (Blanchard, Brailly Tabard, *et al.*, 2020). Ces apports sont loin des valeurs recommandées d'un maximum d'environ 1,5g de Na<sup>+</sup> par jour et minimal d'environ 4,7g de K<sup>+</sup> par jour. Heureusement, grâce à nos reins, nous avons la capacité de faire face à ces changements alimentaires survenus très récemment à l'échelle historique. Cependant, ces modifications alimentaires peuvent, à long terme, contribuer au développement de maladies telles que l'hypertension et sont corrélées à un risque plus élevé de mortalité dans le contexte d'un fond génétique favorable avec des polymorphismes qui seraient restés silencieux dans le cadre d'une alimentation moins industrielle (Mente *et al.*, 2014; O'Donnell *et al.*, 2014). Une carence en K<sup>+</sup> dans l'alimentation est une situation induisant une adaptation globale de l'organisme, impliquant des processus de régulation coordonnés, afin d'assurer l'homéostasie potassique (McDonough, Thompson and Youn, 2002; Youn and McDonough, 2009). Comme détaillé dans l'introduction générale (cf. **Homéostasie du potassium**), l'homéostasie du K<sup>+</sup> fait intervenir deux types de balances: interne et externe. La balance interne, qui permet une modulation rapide de la concentration plasmatique de K<sup>+</sup>, et dont l'acteur majeur est le muscle, capable de stocker du K<sup>+</sup> dans les tissus ou de le relarguer dans le compartiment extracellulaire sous le contrôle de l'insuline. Dans le cadre d'une carence potassique, le muscle devient résistant à l'insuline. Il ne stocke plus de K<sup>+</sup> et en libère une fraction vers le compartiment extracellulaire afin de maintenir une kaliémie stable (Choi *et al.*, 2001; McDonough, Thompson and Youn, 2002). En parallèle, la balance externe dont, l'acteur majeur est le rein, permet de

retenir le  $K^+$  dans l'organisme ou de l'excréter selon les apports journaliers. Dans le cadre d'une restriction potassique, plusieurs mécanismes se mettent en place au niveau rénal ; 1/ La sécrétion de  $K^+$  par les cellules principales est inhibée, *via* l'inhibition du canal  $K^+$  ROMK et du canal  $Na^+$  ENaC (Wang and Giebisch, 2009). 2/ La réabsorption est activée au niveau des cellules intercalaires de type A, *via* la stimulation progestérone dépendante de la  $H^+,K^+$ -ATPase de type 2 (HKA2) (Elabida *et al.*, 2011) et l'augmentation du nombre de cellules intercalaires de type A (Elger, Bankir and Kriz, 1992; Cheval *et al.*, 2004). La plasticité cellulaire du canal collecteur permet au rein de modifier sa structure pour répondre au stress lié à des variations ioniques soit par une transdifférenciation à partir d'un autre type cellulaire et/ou par l'induction d'une prolifération cellulaire (Cheval *et al.*, 2004; Iervolino *et al.*, 2020). Les facteurs permettant de réguler ces mécanismes d'adaptation demeurent cependant mal déterminés. Une analyse transcriptomique effectuée au sein de notre laboratoire a démontré que l'expression du gène codant pour le facteur de croissance GDF15 (Growth Differentiation Factor 15) était augmentée dans les canaux collecteurs de souris déplétées en  $K^+$ . Ce facteur de croissance nous intéresse particulièrement car dans une étude précédente menée par notre laboratoire il a été démontré qu'il était produit par les cellules principales et qu'il induisait la prolifération des cellules intercalaires de type A dans le cadre d'une acidose métabolique (Cheval *et al.*, 2021).

## 2. Le facteur de croissance GDF15

### a) Historique

GDF15 est un facteur de croissance, et une cytokine sécrétée en réponse à des conditions de stress cellulaire, qui appartient à la famille des  $TGF\beta$ , découvert en 1997. Il est aussi appelé MIC-1, pour **M**acrophage **I**nhibitory **C**ytokine **1**, car les premières études menées à son sujet ont démontré que GDF15 est une protéine autocrine capable d'inhiber les macrophages activés par les lipopolysaccharides (Bootcov *et al.*, 1997). Des études ultérieures ont mis en évidence différentes fonctions de GDF15, de par ce fait il possède d'autres appellations. Il a été désigné comme le gène-1 activé par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (NAG-1), facteur de croissance  $\beta$  du placenta (PTGFB), facteur dérivé de la prostate (PDF) (Lawton *et al.*, 1997; Paralkar *et al.*, 1998; Baek, Horowitz and Eling, 2001).

### b) Structure et voies de signalisations

#### Structure et expression de GDF15

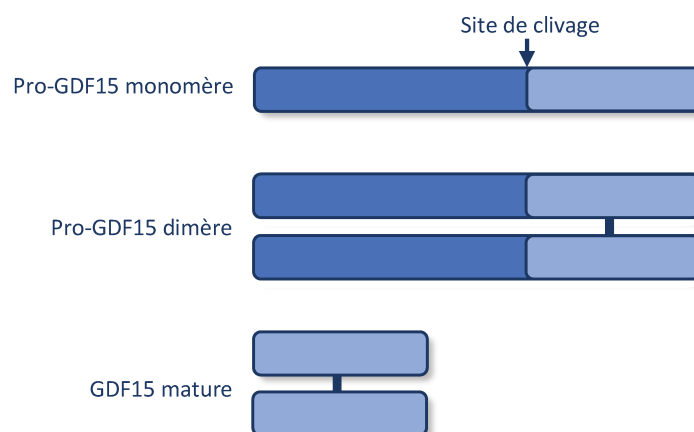
GDF15 appartient à la famille des  $TGF\beta$ . Ces derniers forment un groupe de protéines structurellement apparentées qui jouent un rôle crucial dans la régulation de diverses fonctions cellulaires, notamment le développement embryonnaire, l'homéostasie cellulaire, la croissance

cellulaire, la différenciation, l'adhésion, la migration, la prolifération et l'apoptose (Assadi, Zahabi and Hart, 2020). Le gène codant GDF15 se trouve sur le chromosome 19p12-13.1, et contient 2746 paires de bases. Les gènes murins et humains présentent uniquement 70% d'homologie, mais sont tous deux composés de deux exons séparés par un intron (Jiang *et al.*, 2018) [voir **Figure 12**].



**Figure 12** : Structure du gène murin codant la protéine GDF15. (Figure modifiée de Assadi *et al.*, 2020)

GDF15 est synthétisé sous la forme inactive d'une pro-hormone de 167 amino-acides de 40 kDa. Il est ensuite dimérisé dans le réticulum endoplasmique avant d'être activé par clivage du site furine-like formant un dimère peptidique de 25 kDa (Rochette *et al.*, 2020) [voir **Figure 13**]. La forme non clivée de GDF15 possède une grande affinité pour la matrice extracellulaire, où elle forme un réservoir permettant la sécrétion rapide vers la circulation après protéolyse. Seule la forme mature est sécrétée dans la circulation (Bauskin *et al.*, 2010). Ce gène code également pour une forme tronquée de GDF15, de 27 kDa, possédant les domaines de fixation du ligand mais pas de domaine transmembranaire (Li *et al.*, 2005). Cette forme soluble de GDF15, dont la fonction n'est pas claire, permettrait de bloquer l'action de GDF15 agissant comme un récepteur soluble (Breit, Brown and Tsai, 2021, p. 15).



**Figure 13** : Représentation des différentes formes de GDF15. (Figure modifiée de Assadi *et al.*, 2020)

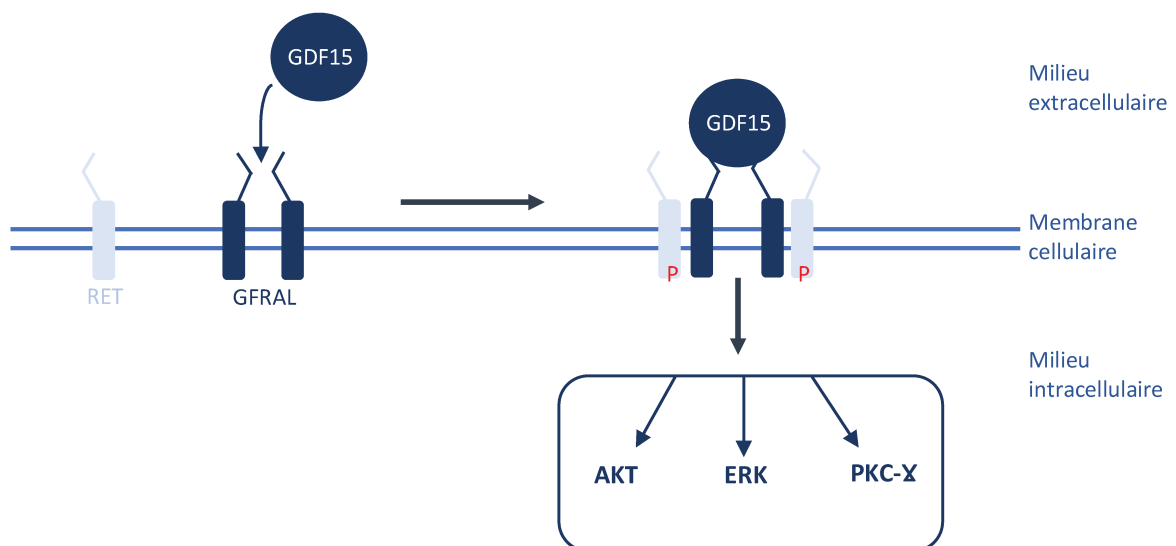
GDF15 est fortement exprimé dans la prostate et le placenta mais il est aussi plus faiblement exprimé dans différents tissus comme les reins, les poumons, le foie, l'intestin, le côlon, le



pancréas, et la glande mammaire (Hromas *et al.*, 1997; Böttner *et al.*, 1999; Marjono *et al.*, 2003; Mimeault and Batra, 2010; Emmerson *et al.*, 2018). Il a aussi été démontré que l'expression de GDF15 était induite en réponse à des conditions de stress cellulaire (V. W. W. Tsai *et al.*, 2018).

### Voies de signalisations

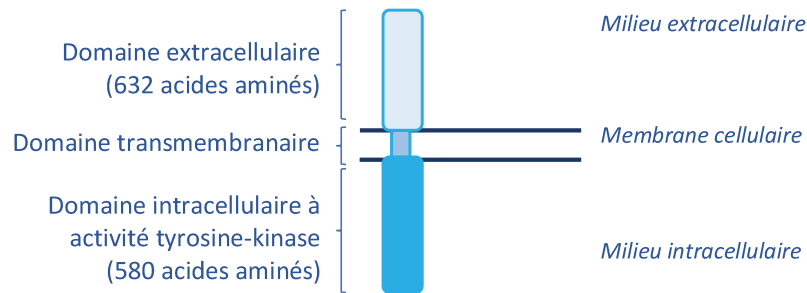
Bien que la voie de signalisation induite par GDF15 ne soit pas complètement élucidée, des études ont démontré que GDF15 était le ligand du récepteur  $\alpha$ -like de la famille GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor), GFRAL. Le récepteur GFRAL est une protéine de 44 kDa avec un seul domaine transmembranaire, et un domaine cytoplasmique court. Le gène codant pour la protéine est constitué de 6 exons, sur le chromosome 6p12.1, chez l'homme, et la séquence est fortement conservée chez la souris. L'expression de GFRAL est limitée au cerveau (zone postrema et noyau du tractus solitaire) et n'est pas retrouvée dans les tissus périphériques (Mullican *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2019). Après liaison au récepteur, le complexe GDF15-GFRAL se lie et phosphoryle le co-récepteur tyrosine kinase RET. La phosphorylation de RET active les voies de signalisations AKT, ERK1/2 et PKC mais pas la voie de signalisation SMAD contrairement aux autres facteurs de croissance de la famille des TGF $\beta$  (Assadi, Zahabi and Hart, 2020) [voir **Figure 14**].



**Figure 14** : Schéma des voies de signalisations induites par GDF15 via le récepteur GFRAL.

La limitation de l'expression du récepteur GFRAL alors que GDF15 a une action pléiotropique laisse supposer la présence d'autres récepteurs. Dans des études récentes, il a été proposé que le récepteur tyrosine-protéine kinase (ErbB2) est également un récepteur de GDF15. ErbB2, également appelé HER2 ou NEU, appartient à la famille des récepteurs transmembranaires

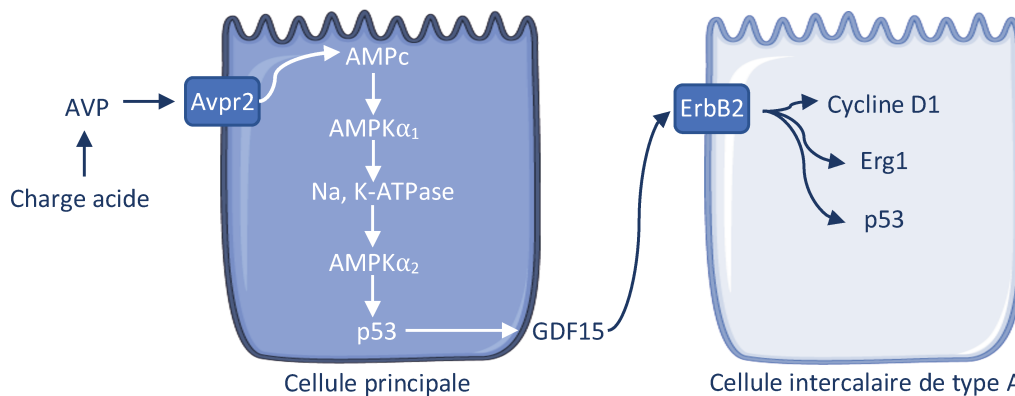
tyrosines kinases ERBB. Cette famille est composée de 4 récepteurs HER1, HER2 (qui correspond au récepteur ErbB2), HER3 et HER4. Les récepteurs existent sous la forme de monomères ou de dimères. ErbB2 est un récepteur transmembranaire de 185 kDa, de 1255 acides aminés, composé d'un domaine extracellulaire de liaison du ligand de 632 acides aminés et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase de 580 acides aminés (Coussens, 1985) [voir **Figure 15**].



**Figure 15** : Schéma de la structure du récepteur ErbB2 (HER2).

Dans un contexte physiologique, le récepteur ErbB2 possède un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Cependant, sa surexpression est associée au développement de plusieurs cancers. Il a d'ailleurs été démontré que, dans des cellules cancéreuses du sein et gastriques humaines, GDF15 favorisait la prolifération des cellules tumorales *via* l'activation du récepteur ErbB2 et de la voie de signalisation AKT et ERK-1/2 (Kim *et al.*, 2008). Ce lien entre le récepteur ErbB2 et GDF15 a été de nouveau étudié dans le cadre de cellules cancéreuses du col de l'utérus ; démontrant que GDF15 activait également ErbB2 dans ce contexte et les voies de signalisations PI3K/AKT et MAPK/ERK (Li *et al.*, 2018). Il a également été démontré dans notre laboratoire un lien entre GDF15 et le récepteur ErbB2 dans le cadre d'une acidose métabolique. L'acidose métabolique nécessite l'entrée en prolifération des cellules intercalaires de type-A afin que ces dernières puissent sécréter des protons et ainsi maintenir la balance acido-basique de l'organisme. Il a été démontré que GDF15 est produit et sécrété par les cellules principales. GDF15 active ensuite le récepteur ErbB2 présent au niveau des cellules intercalaires de type A, induisant l'expression de la cycline D1, p53 et Egr1. Selon ce modèle, GDF15 déclenche donc l'entrée dans le cycle cellulaire par l'induction de cycline D1, il favorise la mise en place du point de contrôle G1-S par l'induction de p53 et il participe à la levée de ce point de contrôle par l'induction d'Egr1 (Van Huyen *et al.*, 2008; Cheval *et al.*, 2021) [voir **Figure 16**]. Enfin, il a été démontré dans la littérature que GDF15 et ErbB2 ont été immunoprécipités ensembles, cependant il n'existe pas de preuve

formelle prouvant l'activation du récepteur ErbB2 par une interaction direct avec GDF15 (Li *et al.*, 2018).



**Figure 16** : Schéma des mécanismes de signalisations mis en place au niveau des cellules intercalaires de type A, impliquant GDF15 et le récepteur ErbB2 dans le cadre d'une acidose métabolique. La charge acide stimule la synthèse de vasopressine, qui induit la production d'AMPc et des kinases AMP-dépendantes via sa liaison au récepteur Avpr2. Les deux isoformes AMPKα<sub>1</sub> et AMPKα<sub>2</sub> sont nécessaires à la production de Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase et p53, respectivement. Dans ce contexte, p53 permet la production de GDF15.

### c) Régulation de l'expression de GDF15 et de sa concentration plasmatique

Les protéines intracellulaires clés qui régissent la transcription du gène GDF15 comprennent p53 et EGR-1 (Kannan *et al.*, 2000; Baek *et al.*, 2004). P53 est un gène suppresseur de tumeur. P53 est une protéine qui agit en tant que facteur de transcription, c'est-à-dire qu'elle se fixe de manière spécifique sur les régions régulatrices de gènes. En condition physiologique p53 est peu exprimée dans le noyau. Dans des conditions de stress cellulaire, comme lors de dommages à l'ADN, p53 peut arrêter le cycle de progression, afin qu'il y ait réparation de l'ADN ou bien induire l'apoptose (Soussi, 2006). EGR-1 est également un facteur de transcription nucléaire important pour les processus de prolifération, différenciation cellulaire et d'apoptose (Wang *et al.*, 2021). Récemment, des facteurs de transcription de la voie de signalisation induite par un stress, tels que CHOP et ATF4, ont également été identifiés comme des activateurs de l'expression de GDF15 (Chung *et al.*, 2017; Li, Zhang and Zhong, 2018; Patel *et al.*, 2019). Il n'est donc pas surprenant que la concentration plasmatique de GDF15 augmente en cas de stress physiologique, et dans des conditions pathologiques. Chez l'homme, la concentration plasmatique de GDF15 augmente avec des facteurs tels que l'âge, le tabagisme, la consommation de drogues, et en réponse aux stress métaboliques comme le diabète (Patel *et al.*, 2019). Il a aussi été démontré que GDF15 augmente en réponse à un effort physique, où il est produit par les muscles (Laurens *et al.*, 2020). Les taux sériques de GDF15 augmentent également dans la plupart des types de cancer, les maladies inflammatoires chroniques, les maladies cardiovasculaires et rénales, les infections graves, et peuvent prédire

la mortalité toutes causes confondues (Lajer *et al.*, 2010; Wiklund *et al.*, 2010; Wollert, Kempf and Wallentin, 2017; Luan *et al.*, 2019). Il a aussi été démontré que la concentration plasmatique de GDF15 augmente avec l'utilisation de certains traitements, notamment la metformine, et lors de thérapies anticancéreuses telles que la chimiothérapie et l'irradiation ionisante, ainsi que lors de lésions tissulaires (Schober *et al.*, 2001; Okazaki *et al.*, 2006; Gerstein *et al.*, 2017). Ces données font de GDF15 un potentiel biomarqueur important dans différentes pathologies. Cependant, selon les études et les contextes physiopathologiques l'élévation de la concentration plasmatique de GDF15 est parfois favorable, ou défavorable au pronostic vital. Cela souligne le besoin d'études supplémentaires sur les mécanismes impliquants GDF15.

#### *d) Rôles physiologiques de GDF15*

##### **GDF15 et cerveau**

Un grand nombre d'études ont été menées sur la physiologie de GDF15 dans le cerveau, de par la spécificité d'expression de son premier récepteur mis en évidence : GFRAL. Bien qu'en condition physiologique son expression soit faible, GDF15 est retrouvé dans la majeure partie des régions du système nerveux central avec une forte concentration au niveau du plexus choroïde qui sécrète la protéine dans le liquide céphalorachidien. GDF15 est aussi sécrété par les cellules de Schwann et son expression est également retrouvée au niveau du système nerveux périphérique (Strelau *et al.*, 2009). GDF15 joue un rôle neurotrophique et neuroprotecteur afin de maintenir en vie les neurones dopaminergiques et les motoneurones (Strelau *et al.*, 2000). Il a également été démontré qu'à la suite de cryolésions ou de lésions ischémiques cérébrales, les niveaux d'ARNm et de protéines de GDF-15 sont considérablement augmentés dans les neurones à la fois sur le site de la lésion et dans les populations neuronales se projetant vers la zone lésée (Schober *et al.*, 2001; Schindowski *et al.*, 2011, p. 15). En absence de GDF15, on observe une dégénérescence des motoneurones et des neurones sensoriels (Strelau *et al.*, 2009). De plus, les souris n'exprimant pas cette protéine ont plus de risques de développer une intoxication au 6-hydroxydopamine. Cette molécule induit une perte des neurones dopaminergiques et est utilisée afin de modéliser la pathologie de Parkinson. Ces résultats suggèrent que GDF15 jouerait potentiellement un rôle protecteur contre la maladie de Parkinson (Machado *et al.*, 2016). Des études ont aussi démontré que ce facteur de croissance était augmenté lors de pathologies neurodégénératives comme la démence ou l'atrophie cérébrale, où il agirait comme un mécanisme de protection qui permettrait de diminuer l'inflammation et protéger les neurones (Chai *et al.*, 2016; Jiang, Wen and Sachdev, 2016).

Enfin, il a également été observé que GDF15 protège les neurones de l'apoptose induite lors d'une déplétion potassique par l'activation de la voie Akt et l'inhibition de la voie Erk (Subramaniam, Strelau and Unsicker, 2003).

#### GDF15 métabolisme, et régulation de l'appétit

Le rôle du GDF15 dans le contrôle de l'appétit et la régulation du poids corporel a été mis en évidence en 2007, lorsqu'il a été constaté le développement d'un syndrome d'anorexie-cachexie par des souris ayant reçu une xénogreffe de cellules tumorales prostatiques humaines surexprimant GDF15. La perte de poids chez ces souris était proportionnelle à la concentration plasmatique de GDF15 issue de la tumeur, et correspondait à une perte de masse grasse et de masse maigre, en grande partie due à la réduction de la prise alimentaire. Dans cette même étude, il a été mis en évidence l'existence d'une corrélation entre l'amplitude de la perte de poids et le niveau de GDF15 circulant dans une cohorte de patients atteints du cancer de la prostate suggérant que les résultats observés chez la souris se transposent aussi chez l'humain. (Johnen *et al.*, 2007). Il a également été démontré que la surexpression de GDF15 entraîne une diminution de l'apport alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique, observée par une augmentation de l'expression de gènes thermogéniques et lipolytiques des tissus adipeux bruns et blancs respectivement (Macia *et al.*, 2012; Chrysovergis *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que lorsque la zone postrema et le noyau du tractus solitaire, régions du cerveau importantes pour la régulation de l'appétit et où le récepteur GFRAL est exprimé, ont été supprimés chez la souris, GDF15 n'est plus capable d'induire une diminution de la prise alimentaire et du poids (Tsai *et al.*, 2014). L'effet de GDF15 sur le contrôle de l'appétit passe par le récepteur GFRAL, la phosphorylation du co-récepteur RET induisant l'activation des voies de signalisation AKT, ERK et PLC- $\gamma$  (Mulligan *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017) [voir **Figure 14**]. De plus, la surexpression de GDF15 réduit la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose (Xiong *et al.*, 2017; V. W. Tsai *et al.*, 2018). À l'inverse, il a été observé que les souris déficientes pour GDF15 présentaient une augmentation du poids, de la masse grasse et de la prise alimentaire, ce qui confirme que GDF15 est un régulateur du métabolisme (Tsai *et al.*, 2013). Il est également intéressant de noter que les souris déficientes pour GDF15 restent sensibles à GLP-1 et à la leptine, deux hormones de satiété. Les souris délétées des récepteurs de GLP-1 et la leptine continuent à perdre du poids en réponse à GDF15, suggérant que l'axe GDF15/GFRAL est indépendant de ces voies connues pour contrôler la prise alimentaire (Mulligan and Rangwala, 2018). Ces souris sont également sujettes à un dépôt important de lipides dans le foie et au développement de symptômes similaires à la stéatose hépatique non alcoolique (NASH/NAFLD) alors que les souris transgéniques surexprimant GDF15 y sont

résistantes (Kim *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent que GDF15 possède un intérêt thérapeutique pouvant réguler la progression de maladies métaboliques comme l'obésité et le diabète.

#### GDF15 et cancer

Comme décrit **ci-dessus**, l'expression de GDF15 est induite par le gène p53 et EGR-1. Deux protéines connues pour être impliquées dans les processus de cancer. Comme d'autres membres du TGF $\beta$ , GDF15 semble également jouer un rôle dans différents cancers. Cependant, son rôle changerait selon le stade de la maladie. Aux premiers stades, GDF15 semblerait jouer un rôle anticancéreux, tandis qu'aux stades avancés du cancer, il semblerait agir comme un facteur pro-tumorigène (Massagué, 2008). Il a été démontré que GDF15 avait un rôle suppresseur de tumeur, son expression est augmentée par p53 et induit l'apoptose ces cellules tumorales dans le carcinome de la vessie (Tsui *et al.*, 2015). De manière intéressante, il a été observé que la surexpression de GDF15 dans des modèles de cancer de la tête et du cou favorisait la prolifération tumorale *via* la phosphorylation du récepteur ErbB2 et l'activation des voies de signalisation Akt et Erk (Lv *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022). Ce rôle pro-tumorigène a été confirmé dans une autre étude, où il a été démontré que GDF15 induisait la prolifération des cellules cancéreuses de l'utérus *via* le récepteur ErbB2, l'activation des voies de signalisation Akt et Erk et l'augmentation des cyclines D1 et E1 (Li *et al.*, 2018). Il a également été observé que l'activation du récepteur ErbB2 par GDF15 dans le cancer du sein était responsable de la résistance au traitement par le trastuzumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur ErbB2 (Joshi *et al.*, 2011). Les données contradictoires concernant le rôle de GDF15 dans la tumorigenèse pourraient être attribuables au type de cellule et au contexte cellulaire, ou à l'activation d'un mécanisme dépendant du stade des cancers.

D'autre part, l'augmentation de GDF15 est directement associée à la sévérité du cancer. Il a également été montré que les syndromes d'anorexie/cachexie dans les stades avancés de cancer sont liés à des concentrations élevées de GDF15 circulant chez les patients (V. W. W. Tsai *et al.*, 2018). GDF15 est donc un biomarqueur et un facteur de pronostic dans le développement du cancer. De plus, des approches thérapeutiques comme l'injection d'anticorps spécifiques contre GDF15 afin de traiter le syndrome d'anorexie/cachexie dans les cas avancés de cancer sont envisagés (Mimeault and Batra, 2010).

#### GDF15 et muscles

Le muscle squelettique est un organe sécrétoire qui libère des myokines. Ces protéines sont libérées dans la circulation pour agir de manière auto/paracrine ou endocrine. L'exercice physique est un stimulus permettant la libération de myokines *via* la contraction musculaire

(Ost *et al.*, 2016). En condition physiologique, GDF15 est faiblement exprimé au niveau du muscle mais son expression est augmentée lors d'un effort physique important et en réponse au stress mitochondrial musculaire. Une étude a mis en évidence que l'expression GDF15 dans les muscles squelettiques à la suite d'un stress mitochondrial diminue la résistance à l'insuline et protège contre l'obésité induite par le régime alimentaire en induisant la lipolyse et le métabolisme oxydatif dans le foie, les muscles et le tissu adipeux blanc (Ost *et al.*, 2020). Dans une autre étude, il a été démontré que GDF15 était produit à la suite d'un stress cellulaire, engendré par la contraction musculaire, et induisait la lipolyse du tissu adipeux blanc dans un modèle de cellules primaires humaines de muscle squelettique (Laurens *et al.*, 2020). Lors d'un dysfonctionnement mitochondrial musculaire, l'élévation de la concentration plasmatique de GDF15 est plus importante la journée que la nuit, mis en évidence par une baisse de la prise alimentaire plus importante en journée (Ost *et al.*, 2020). Il a été démontré que dans le cadre d'un stress mitochondrial, GDF15 est synthétisé *via* la voie de signalisation CHOP (Chung *et al.*, 2017) [voir [ci-dessus](#)]. Il a également été observé que GDF15 et d'autres gènes impliqués dans le stress oxydatif mitochondrial sont surexprimés à la suite de l'activation de la voie de signalisation mTORC1 (protéine kinase à sérine-thréonine conservée), provoquant des dommages aux myofibrilles et le vieillissement des fibres musculaires squelettiques dans la sarcopénie (Tang *et al.*, 2019). Il a d'ailleurs été proposé d'utiliser GDF15 comme un biomarqueur de la sarcopénie, car il est négativement corrélé à la perte de masse musculaire et à la capacité physique, donc au développement de la maladie (Kim *et al.*, 2020).

### GDF15 et reins

En condition physiologique, GDF15 permet d'une part, de réguler la production de la matrice extracellulaire rénale, d'autre part, de favoriser la prolifération des cellules épithéliales tubulaires via la voie de signalisation MAPK (Nair *et al.*, 2017). Dans une étude menée par notre laboratoire, il a été mis en évidence que GDF15 était responsable de l'entrée en prolifération des cellules intercalaires de type A en réponse à une acidose métabolique, ces cellules permettant de sécréter des protons contribuant ainsi à rétablir l'équilibre acido-basique de l'organisme. Cet effet sur la prolifération des cellules intercalaires de type A passe par le récepteur ErbB2 (Cheval *et al.*, 2021) [voir [ci-dessus](#)]. Par ailleurs, dans les modèles murins de diabète de type 1 et de type 2, les souris GDF15<sup>-/-</sup> sont sujettes à davantage de lésions tubulaires et de dommages interstitiels ainsi qu'à des signes plus importants de glycosurie et de polyurie par rapport aux souris diabétiques WT, ce qui suggère que GDF15 est nécessaire au maintien de l'intégrité tubulaire (Mazagova *et al.*, 2013). Dans les maladies rénales chroniques, la concentration de GDF15 est augmentée, ce qui fait de lui un biomarqueur potentiel (Perez-

Gomez *et al.*, 2021). Dans l'étude menée par le laboratoire de Perez-Gomez *et al.* les niveaux de GDF15 ont été évalués à partir d'échantillons d'urines, ouvrant la possibilité à un test non invasif permettant d'évaluer le développement de la maladie rénale chronique (Perez-Gomez *et al.*, 2021).

Il existe actuellement peu de publications sur le rôle du GDF15 dans les reins, il est donc nécessaire de poursuivre les recherches sur son rôle dans la physiologie et physiopathologie rénale.

### 3. Objectif de l'étude

GDF15 est un facteur de croissance qui intervient dans différents processus physiologiques et physiopathologiques. Sa fonction est différente selon l'organe et le stade du mécanisme étudié. Dans le rein, et plus particulièrement au niveau des cellules intercalaires de type A, notre laboratoire a démontré que GDF15 était responsable de l'entrée en prolifération de ces cellules dans le cadre d'une acidose métabolique (Van Huyen *et al.*, 2008; Cheval *et al.*, 2021). Une analyse transcriptomique, également effectuée au sein de notre laboratoire, a démontré que l'expression du gène codant GDF15 était augmentée dans les canaux collecteurs de souris déplétées en  $K^+$  (Cheval *et al.*, 2004). L'objectif de cette étude est donc de caractériser le rôle de GDF15 dans l'adaptation rénale à un régime faible en  $K^+$ .



## II. Matériels et méthodes

### 1. Modèle d'étude

Toutes les expériences ont été réalisées sur des souris mâles pesant 25 à 30g. La lignée de souris génétiquement invalidées pour le gène *Gdf15*, codant la protéine Gdf15 (avec un fond C57BL6/J), est maintenue dans notre animalerie, au Centre d'Explorations Fonctionnelles des Cordeliers. Ces souris dérivent d'une colonie fournie par Dr. Se-Jin Lee (John Hopkins University, Baltimore, MD)(Hsiao *et al.*, 2000). Les souris contrôles sont des souris commerciales C57BL/6J (Charles River).

Les animaux ont été nourris avec un régime standard de laboratoire (0.3 % Na<sup>+</sup> and 0.6 % K<sup>+</sup>; UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France) ou un régime faible en potassium (0.28% Na<sup>+</sup> and 0.01 % K<sup>+</sup>; UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France). Le traitement au Mubritinib a été administré par gavage à raison de 2 administrations par jour (Selleckchem, 8mg/kg/jour), pendant 4 jours en parallèle d'un régime standard ou d'un régime faible en potassium. Les souris ont été sacrifiées, en fin d'expérimentation, par l'administration intrapéritonéale de Kétamine (10 mg/kg) et de Xylazine (100 mg/kg) dans du sérum physiologique.

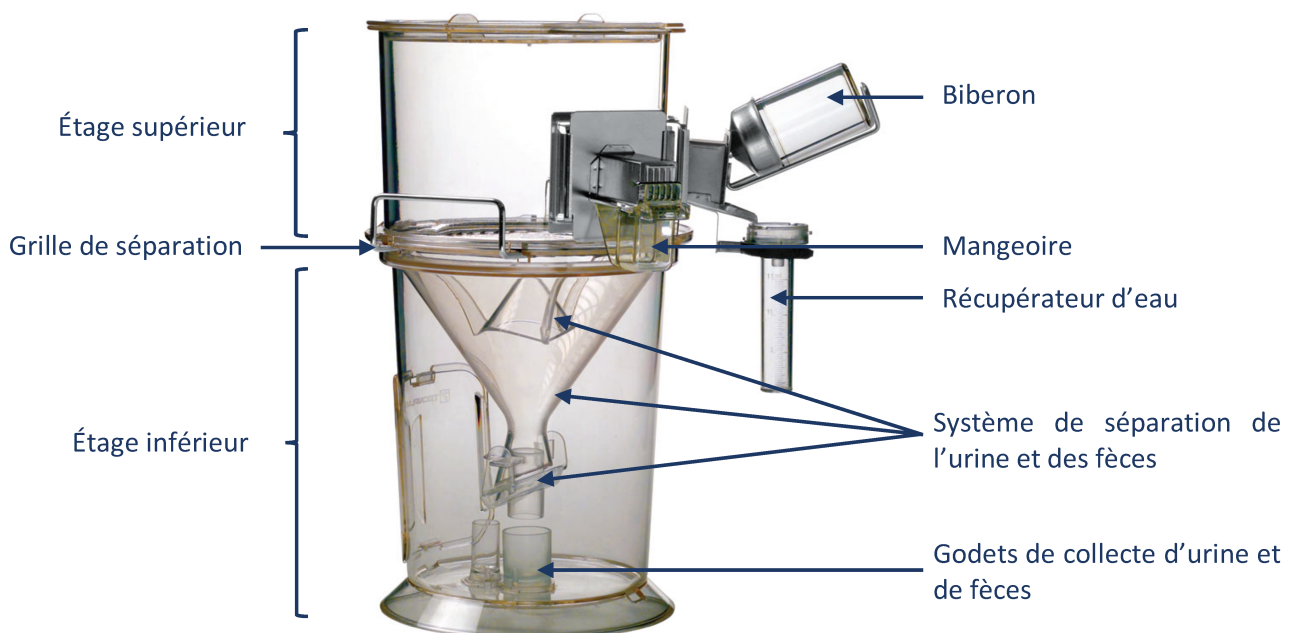
### 2. Analyses métaboliques

#### a) *Analyse des échantillons d'urine humaine*

Les échantillons d'urine ayant servi à la mesure de Gdf15 proviennent d'une étude précédente menée par le Dr. Anne BLANCHARD (Hôpital Européen Georges Pompidou, MD)(Blanchard, Brailly Tabard, *et al.*, 2020). L'étude a été approuvée par le comité éthique local (P120906 – CPP Ile de France VI, NCT02297048) et le consentement informé a été obtenu de la part des volontaires avant de participer à cette étude (enregistré au registre des essais cliniques NCT02297048). Les volontaires sains étaient de type Caucasien, de sexe masculin, âgés entre 18 et 35 ans. Les critères d'inclusion étaient les suivants : un **Indice de Masse Corporel (IMC)** compris entre 18 et 30 kg/m<sup>2</sup>, un ionogramme plasmatique et une fonction hépatique dans les normes physiologiques, et un débit de filtration glomérulaire supérieur à 60ml/min/1.73m<sup>2</sup>. Les sujets sains ont été déplétés en potassium par traitement au sodium polystyrène sulfonates (Kayexalate®, Sanofi-adventis France) avec 30g par jour pendant deux jours, suivi d'un régime faible en potassium pendant cinq jours (25 mmol/jour). La concentration urinaire en GDF15 a été analysée avec un test ELISA pour humain (DGD150, R&D Systems).

*b) Analyse des urines des souris en cage à métabolisme*

Les souris ont été placées en cages à métabolisme (Tecniplast) afin de pouvoir recueillir et analyser des urines de 24h, mais aussi afin de pouvoir suivre leur prise alimentaire et leur consommation d'eau. La cage à métabolisme est composée de deux étages. La souris se trouve dans le premier étage, où se trouvent un biberon d'eau et une mangeoire. Un récupérateur d'eau permet de récupérer l'eau lorsque les souris jouent avec les biberons. L'étage supérieur est séparé de l'étage inférieur par une grille, qui permet le passage des urines et des fèces de la souris. Ces derniers s'accumulent dans l'étage inférieur, après avoir été séparés grâce à un système d'entonnoir, dans deux godets différents de recueil [voir **Figure 17**].



*Figure 17 : Photo légendée d'une cage à métabolisme.*

Lors d'expérimentations en cage à métabolisme, la souris est isolée de ses congénères, il n'y a plus d'enrichissement dans son environnement et elle passe d'un régime sous forme de croquettes à un régime sous forme de poudre dans la mangeoire. Pour ces raisons, nous avons inclus une période d'habituation de quatre jours avant chaque début d'expérience afin de stabiliser la prise d'eau, de nourriture et donc de poids des souris. Les souris ont été soumises à un régime standard du laboratoire (0.3 % Na<sup>+</sup> and 0.6 % K<sup>+</sup>; UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France) ou faible en K<sup>+</sup> (0.28% Na<sup>+</sup> and 0.01 % K<sup>+</sup>; UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France). Durant l'expérience, les mesures de prise alimentaire, d'eau et de poids corporelle, ainsi que les recueils urinaires ont été réalisés à heure fixe, chaque matin.

L'analyse des concentrations en créatinine des recueils urinaires a été réalisée à l'aide d'un automate Konelab (Konelab 20i; Thermo, Cergy Pontoise, France). La concentration en Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> a été analysée à l'aide d'un photomètre de flamme Sherwood Scientific™ Clinical Flame Photometer (Sherwood Scientific™ 47542000, Fisher Scientific). La concentration urinaire de GDF15 a été évaluée à l'aide d'un test ELISA pour souris (MG150, R&D Systems).

*c) Analyse de la kaliémie des souris, de la concentration musculaire en K<sup>+</sup>, de la concentration de GDF15 dans le plasma et dans les tissus*

La mesure de la concentration plasmatique en K<sup>+</sup> des souris a été réalisée par prélèvement sanguin rétro-orbital, sur animal anesthésié (Xylazine, 10mg/kg et Kétamine 100mg/kg), à l'aide de l'automate epoc (epoc® blood system analysis, Siemens Healthineers). Les gaz du sang n'ont pas été pris en compte, car non fiables sur animal anesthésié. Au moment du sacrifice, les gastrocnemius ont été prélevés pour mesurer la concentration musculaire de K<sup>+</sup>. Après broyage du tissu dans 1ml d'eau déminéralisée, les lysats ont été incubés dans de l'acide trichloroacétique 20% (TCA) pendant une nuit à 4°C avant d'être centrifugés. Le surnageant a été analysé au photomètre de flamme Sherwood Scientific™ Clinical Flame Photometer (Sherwood Scientific™ 47542000, Fisher Scientific). Le sang des souris a été récupéré par ponction intracardiaque puis centrifugé afin de récupérer le plasma. La concentration plasmatique de GDF15 a été évalué à l'aide d'un test ELISA pour souris (MG150, R&D Systems). La concentration de GDF15 dans les tissus des organes prélevés a été déterminé à l'aide d'un test ELISA pour tissu (E-EL-M0604-96, Elabscience).

*d) Analyse de la masse maigre, de la masse grasse et du fluide extracellulaire par TD-RMN*

La masse maigre, la masse grasse et le fluide extracellulaire des souris en régime standard ou faible en K<sup>+</sup> ont été déterminés, de manière non-invasive, par une méthode de résonance magnétique nucléaire appelée Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-RMN, Minispec LF50, Bruker). Cette technique permet de différencier les protons dans un environnement liquide (fluide extracellulaire) des protons dans les tissus mous contenant une majorité de petites molécules (maigre), ou de grosses molécules (gras). Lorsque les noyaux atomiques sont exposés à un rayonnement électromagnétique (radiofréquence), ils absorbent l'énergie du rayonnement puis la libèrent en se relaxant. Le temps de relaxation varie en fonction de l'environnement, et l'amplitude du signal RMN est proportionnelle à la masse des protons (Morla *et al.*, 2020). Les mesures TD-RMN ont été faites en duplicata pour chaque souris, dont la vessie a été vidée au préalable.

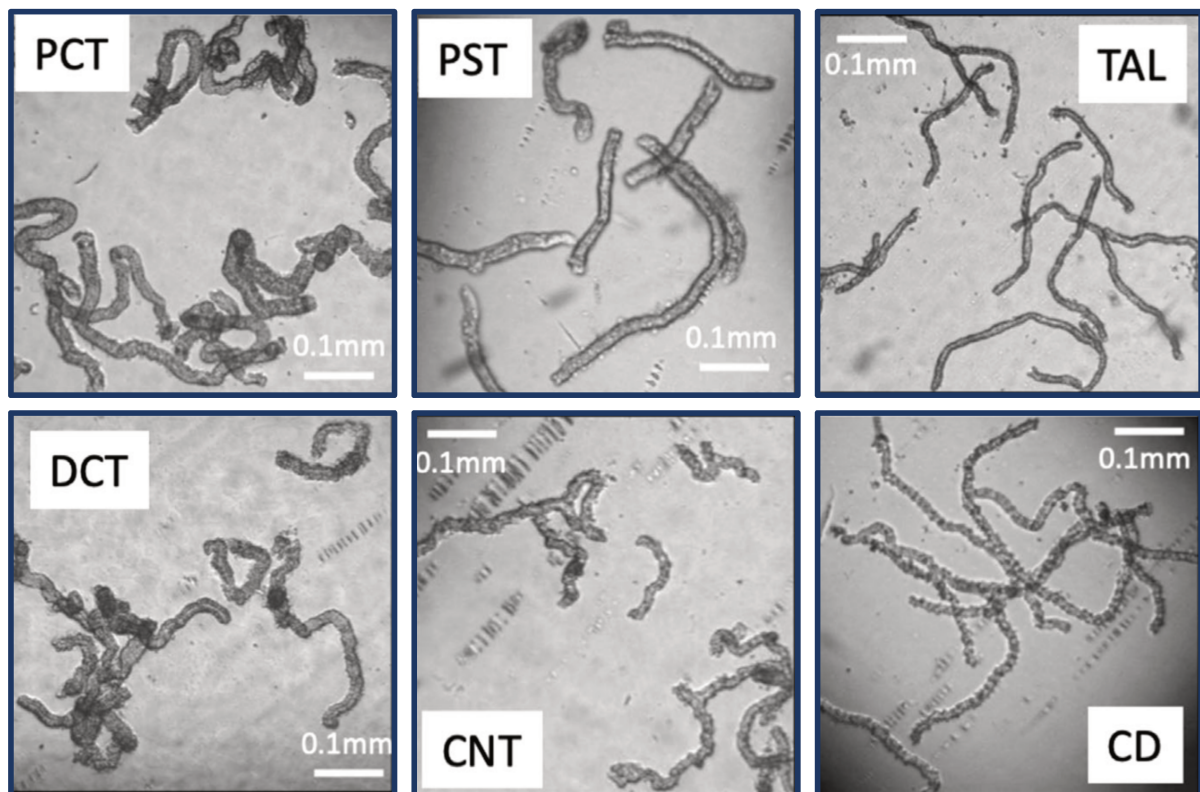
#### e) Analyse des de la masse musculaire des membres postérieurs par RMN

Des mesures RMN ont été effectuées sur des souris WT et GDF15<sup>-/-</sup> à J0 et J4 de restriction potassique. Les mesures RMN ont été réalisées à l'aide d'un système 7T Bruker BioSpec avec un spectromètre Advance III (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlinger, Allemagne). Les souris ont été scannées sous anesthésie de type isoflurane (1-2%, 11/min O<sub>2</sub>) sur coussin chauffant. La fréquence respiratoire a été maintenue entre 80-100 mouvements/minute. La configuration RMN utilisée était une cryosonde de surface à émetteur-récepteur 1H, placée du côté antérieur des deux membres postérieurs. L'atrophie musculaire a été évaluée à partir de la surface maximale de la section transversale des jambes (CSA<sub>max</sub>), mesurée sur une tranche d'image axiale de haute résolution (50\*50\*200 μm<sup>3</sup>) obtenue par écho de gradient (11 tranches, écart de tranche = 0.5mm, TE = 3.66ms, FA = 25°, NA = 12, temps d'acquisition = 8min 18s). Les contours des jambes ont été dessinés à l'aide du logiciel ITK-SNAP 3.8.0 (Free Software Foundation, Inc).

### 3. Analyses biochimiques et biomoléculaires

#### a) Extractions d'ARN et RT-qPCR

Les différentes parties du néphron ont été microdisséquées selon leur localisation dans le rein (corticale ou médullaire) et selon leurs caractéristiques morphologiques [voir **Figure 18**].



**Figure 18** : Photographies des différentes parties microdisséquées du néphron. PCT : Tubule contourné proximal. PST : Partie droite du tubule proximal. TAL : Branche large ascendante de l'anse de Henle. DCT : Tubule contourné distal. CNT : Tubule connecteur. CD : Canal collecteur.

Environ 40 à 60 segments ont été isolés par parties de néphron, après traitement du rein avec de la libérase (Sigma-Aldrich, France).

Les tubules rénaux et les différents organes d'intérêts ont été broyés dans du Trizol (TRI Reagent, Thermo Fischer), avec 1mL de Trizol pour 50 à 100 mg de tissu. Le lysat a été incubé avec du 1-bromo-3-chloropropane (BCP), avec 0,1mL de BCP pour 1mL de Trizol. Le BCP crée trois phases distinctes ; une phase rouge contenant les protéines, une interphase contenant l'ADN et enfin une phase aqueuse transparente contenant l'ARN. La phase aqueuse a été incubée avec du 2-propanol (0,2mL de 2-propanol pour 1mL de Trizol), afin de précipiter l'ARN. Le culot d'ARN formé a été rincé avec de l'éthanol 75%. Les ARN extraits ont ensuite été purifiés sur colonne à l'aide des kits RNeasy micro (74004, Qiagen) et RNeasy Mini (74104, Qiagen) pour les tubules rénaux et les organes respectivement. La concentration d'ARNm extrait a été déterminée par spectrométrie.

Les ARNm extraits ont ensuite été rétro-transcrit (RT) en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit Transcriptor First Strand cDNA synthesis (04896866001, Roche Diagnostic). La rétrotranscription s'est faite avec l'utilisation d'amorces hexamères aléatoires. Des contrôles négatifs, sans reverse transcriptase, ont été réalisés afin de confirmer la pureté d'extraction par l'absence de contamination avec de l'ADN génomique. Les ADNc obtenus ont été dilués puis amplifiés à l'aide du kit Lightcycler 480 SYBR Green I Master (04707516001, Roche Diagnostic) et analysés à l'aide d'une machine de PCR en temps réel Lightcycler 480 (Roche). Les analyses quantitatives en temps réel des gènes d'intérêts ont été normalisées en utilisant le gène de ménage *Rpl26*.

<b>Primers</b>	<b>Séquences UP/DN</b>
<i>Gdf15</i>	5'-GAGCTACGGGGTCGCTTC-3' 5'-GGGACCCCAATCTCACCT-3'
<i>Ccnd1</i>	5'-AGCGGTAGGGATGAAA-3' 5'-CCATCTGAATGCGTG-3'
<i>ErbB2</i>	5'-AAGAGGTCACAGCTGAGGAC-3' 5'-AAAATGCCAGGCTCCCAAAG-3'
<i>Trim63</i>	5'-ACGTGTGAGGTGCCTACTTG-3' 5'-TGGCGTAGAGGGTGTCAAAC-3'
<i>Fxbo32</i>	5'-TCAAAGGCCTCACGATCACC-3' 5'-AATCCAGCTGCCCTTTGTCA-3'
<i>Rpl26</i>	5'-GCTAATGGCACAACCGTC-3' 5'-TCTCGATCGTTTCTTCTTGTAT-3'

**Figure 19** : Séquences des primers

*b) Marquages fluorescents des canaux collecteurs de la médullaire externe et des coupes de muscles.*

Environ 15 à 20 segments de **canaux collecteurs de la médullaire externe** (OMCD) ont été isolés depuis un rein perfusé à la libérase puis transférés sur lame Superfrost Plus (10149870, Fisher Scientific). Les OMCD ont ensuite été lavés deux fois avec du PBS contenant du  $\text{Ca}_2^+$  et du  $\text{Mg}_2^+$ , puis fixés 15 minutes avec du paraformaldéhyde 4% (dilué dans du  $\text{Ca}_2^+$ - $\text{Mg}_2^+$ -PBS). Ensuite, les OMCD ont été lavés une fois avec du  $\text{Ca}_2^+$ - $\text{Mg}_2^+$ -PBS et deux fois avec du  $\text{Ca}_2^+$ - $\text{Mg}_2^+$ -PBS et incubés 20 minutes dans 100 mmol/L de glycine diluée dans du PBS. Après perméabilisation au triton, et démasquage des sites, le blocage des sites aspécifiques a été réalisé avec du PBS contenant 1% de BSA pendant 30 minutes à température ambiante. Les OMCD ont ensuite été incubés, à 4°C toute une nuit, avec un anticorps primaire anti-AE1 dilué au 500<sup>ème</sup> dans du PBS-BSA 1%. Les lames ont été lavées une fois avec du PBS-Tween 0,05% et deux fois avec du PBS et incubées 1 heure dans le noir avec un anticorps secondaire anti-lapin dilué au 500<sup>ème</sup> (TRITC-couplé anti lapin IgG, Jackson ImmunoResearch) et avec du DAPI (1 $\mu$ /mL). Après lavage dans le noir, les lames ont été montées dans un milieu Vectashield et observées au microscope confocal (Zeiss observer.Z1, LSM710).

**Les quadriceps** ont été prélevés et incubés dans du paraformaldéhyde 4%, puis dans du PBS 1X, avant d'être inclus dans des cassettes avec du milieu de montage pour coupes congelées (O.C.T compound Q path® mounting medium for cryotomy, 00411243, VWR). Les marquages ont été réalisés sur de fines coupes transversales de 4 $\mu$ m (Cryostat CM3050 S, Leica). Le démasquage des sites de fixation a été réalisé via l'incubation des coupes dans une solution de Tris-EDTA 1X à 95°C au bain marie, pendant 10 minutes. Les sites aspécifiques ont ensuite été bloqués avec une solution de sérum d'âne 10% dilué dans du PBS, pendant 30 minutes à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées sur la nuit, à 4°C, avec un anticorps anti-laminine (ab11575, Abcam) dilué au 400<sup>ème</sup> dans du sérum d'âne 1%-PBS. Les coupes ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin Alexa Fluor 555 (ab205718, Abcam) dilué au 500<sup>ème</sup> et du DAPI (1  $\mu$ g/mL) pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, les coupes ont été montées sous lamelle dans un milieu glycergel (ab205718, Dako Agilent). L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un scanner de lame (Axio Scan.Z1, Zeiss).

#### 4. Présentation et analyses statistiques des résultats

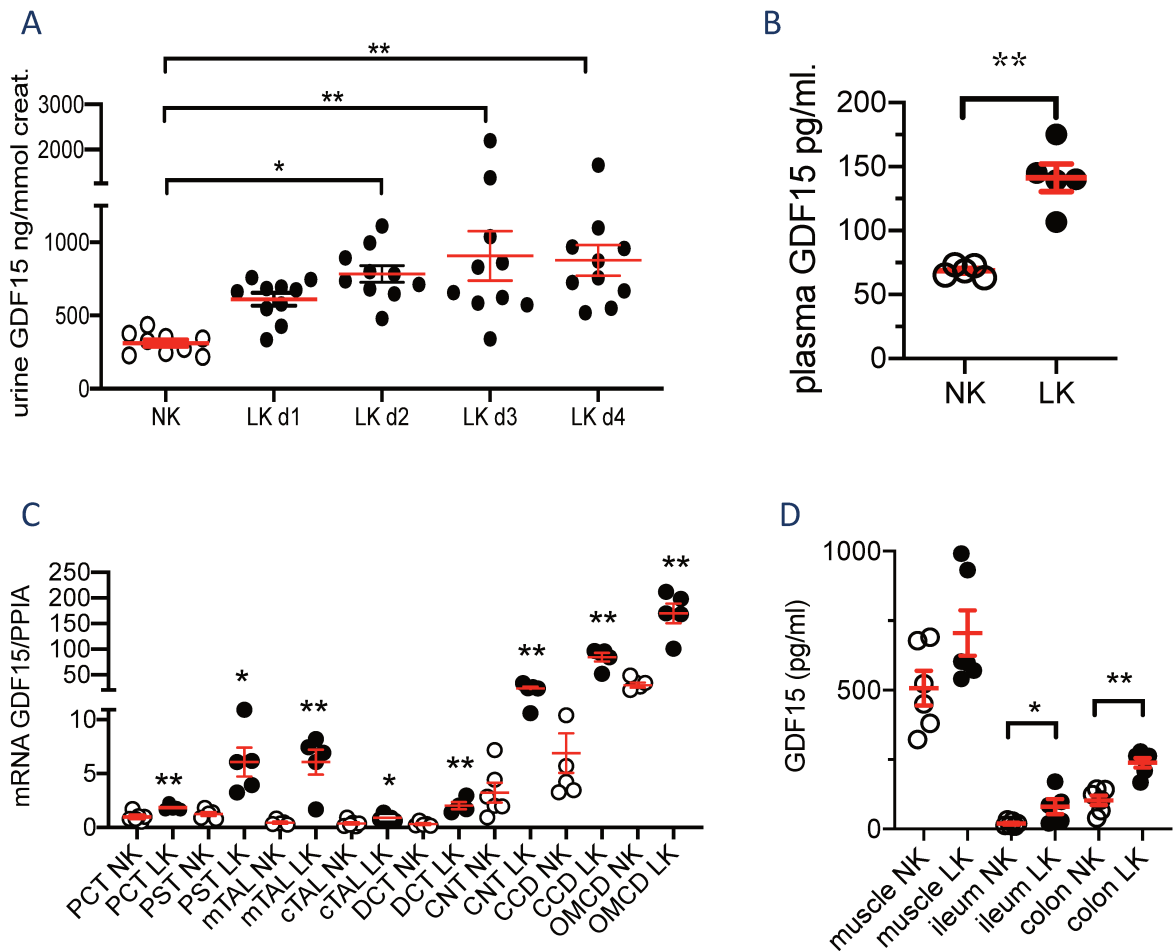
Les résultats sont représentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard (SEM). Le nombre de souris utilisées dans chaque expérience est indiqué dans les légendes (n). Les comparaisons de deux groupes ont été faites à l'aide d'un test T de Student (paire ou non paire, ou avec l'équivalent non paramétrique Mann-Whitney ou Wilcoxon, respectivement). Les comparaisons de plus de deux groupes ont été faites par le biais d'une ANOVA à un ou deux facteurs (ou l'équivalent non paramétrique Kruskal-Wallis). Le choix d'un test paramétrique ou non paramétrique s'est fait sur la base du nombre de souris par échantillon, de la normalité et de l'homoscédasticité des données. Une différence a été considérée comme significative lorsque  $p \leq 0,05$ .

### III. Résultats

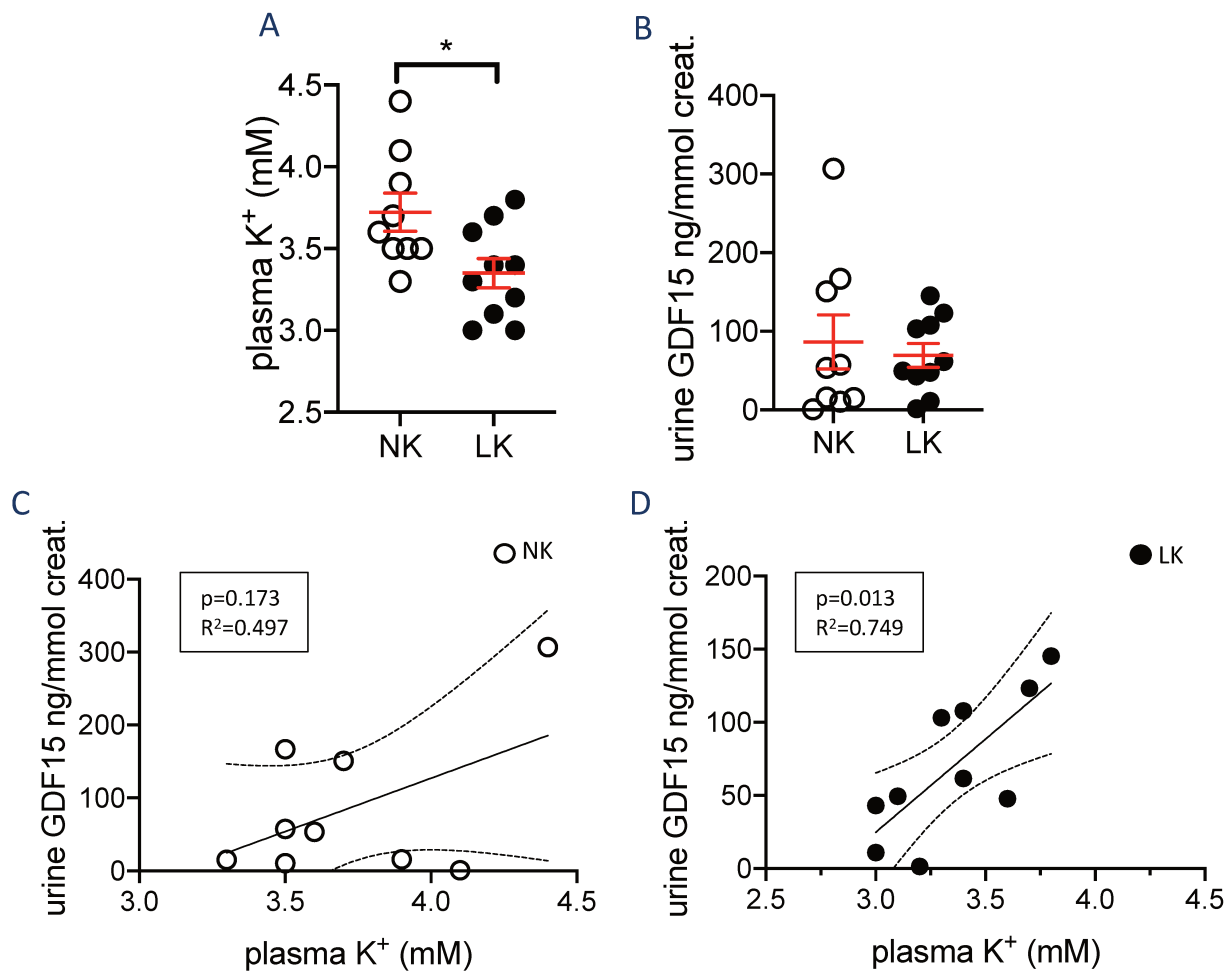
#### 1. GDF15 est augmenté en réponse à un régime faible en potassium

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'expression de GDF15 chez des souris en restriction potassique pendant 4 jours. Nous avons observé que GDF15 augmente dans les urines jusqu'à atteindre un plateau vers le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jour de restriction potassique [voir **Figure 20 A**]. À 4 jours, l'expression de GDF15 est environ 3 fois supérieure comparée à son expression lors d'un régime standard ( $877 \pm 104$  ng/mmol, contre  $310 \pm 25$  ng/mmol, respectivement). En parallèle, la concentration plasmatique de GDF15 double lors d'une restriction potassique [voir **Figure 20 B**]. L'expression de GDF15 est également augmentée le long du néphron [voir **Figure 20 C**]. L'élévation systémique de GDF15 nous a orienté vers l'analyse de la production de GDF15 dans d'autres organes impliqués dans l'homéostasie du  $K^+$ . Nous avons donc mesuré la concentration de GDF15 dans les tissus par ELISA, et elle est significativement augmentée dans l'iléum et le colon des souris en restriction potassique mais pas dans le muscle [voir **Figure 20 D**]. Afin d'étudier si le lien entre un régime faible en  $K^+$  et la production de GDF15 existe chez l'humain, nous avons utilisé des échantillons d'urines d'une précédente étude où des volontaires sains de sexe masculin ont été placés sous restriction potassique pendant une semaine (Blanchard, Brailly Tabard, *et al.*, 2020). On observe que la kaliémie diminue légèrement mais significativement, passant de  $3.7 \pm 0.1$  mmol/L à  $3.35 \pm 0.09$  mmol/L, en réponse à la restriction potassique [voir **Figure 21 A**]. Cependant, si on compare l'excrétion urinaire de GDF15 dans les urines de 24h, nous n'observons pas de différence significative [voir **Figure 21 B**]. Lorsqu'on s'intéresse au lien entre la concentration urinaire de GDF15, qui reflète sa production, et la kaliémie, il n'y a pas de corrélation lors d'un régime standard [voir **Figure 21 C**]. En revanche, après une restriction potassique, l'excrétion urinaire de GDF15 est significativement corrélée à la kaliémie des volontaires sains [voir **Figure 21 D**].





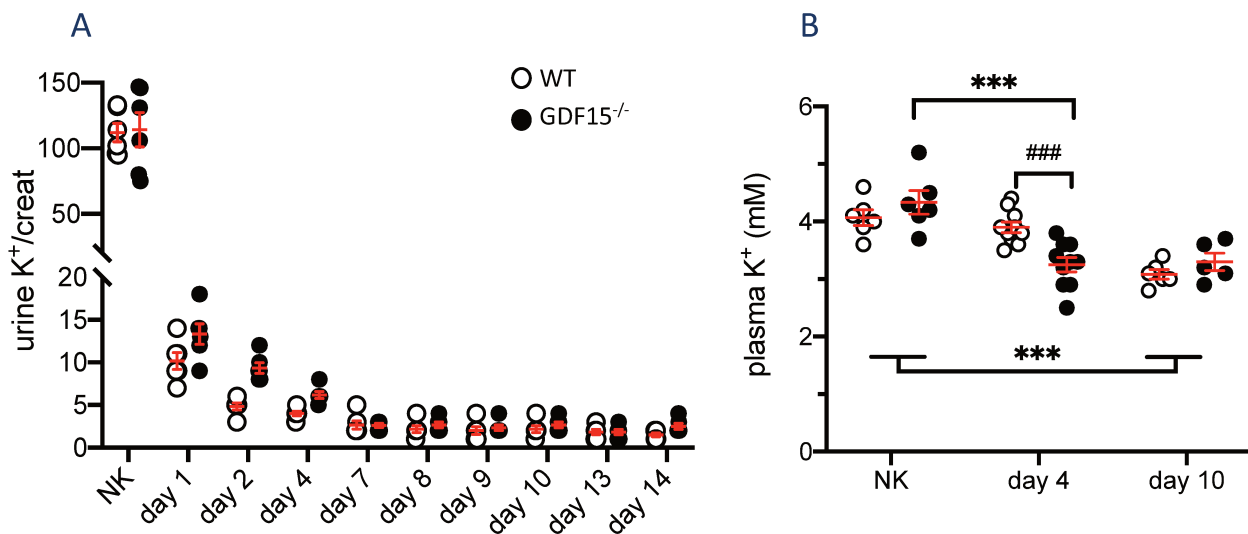
**Figure 20:** Analyse de la production de GDF15 en réponse à une restriction potassique chez la souris. (A) Concentration urinaire de GDF15, normalisée par la créatinine urinaire, provenant de souris en régime standard (NK) ou après 1 à 4 jours de restriction potassique (LK). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=10$ ), analysés à l'aide d'un test ANOVA à un facteur suivi d'une comparaison multiple avec pour contrôle le groupe NK (\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ ). (B) Concentration plasmatique de GDF15 de souris en régime standard (NK) ou après 4 jours de restriction potassique (LK). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=5$ ), analysés à l'aide d'un test T de Student (\*\* $p<0.01$ ). (C) Expression de l'ARNm codant pour GDF15 le long du tubule proximal contourné (PCT), droit (PST), de la zone médullaire et cortical de la branche ascendante large de l'anse de Henle (m et cTAL), du tubule contourné distal (DCT), du tubule connecteur (CNT) et du canal collecteur médullaire et cortical (CCD et OMCD) de souris soumises à un régime standard (NK) ou après 4 jours de restriction potassique (LK). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=5$ ), analysés par comparaison de l'effet du régime dans chaque segment indépendamment des autres via un test Mann-Whitney (\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ ). (D) Mesure de l'expression protéique de GDF15 dans le muscle (gastrocnemius), l'iléum et le côlon par ELISA sur tissu de souris soumises à un régime standard (NK) ou après 4 jours de restriction potassique. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), analysés à l'aide d'un test Mann-Whitney (\*\* $p<0.01$ ).



**Figure 21 :** Analyse de la production de GDF15 en réponse à une restriction potassique chez l'humain. Les groupes d'humains volontaires sains en régime standard (NK, n=9) ou en restriction potassique (LK, n=10) ont précédemment été caractérisés, voir Blanchard et al. 2019. (A) Kaliémie des volontaires sains en régime standard (NK) ou en restriction potassique (LK). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM, analysés par un test Wilcoxon (\* $p < 0.05$ ). (B) Expression urinaire de GDF15 mesurée par ELISA. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM, analysés par un test Wilcoxon (\* $p < 0.05$ ). (C) Corrélations linéaires de volontaires sains en régime standard (NK) et (D) en restriction potassique effectuées à l'aide d'une régression linéaire.

## 2. L'adaptation rénale à un régime faible en potassium est altérée en absence de GDF15

Afin d'étudier le rôle de GDF15, nous avons placé des souris n'exprimant pas GDF15 (GDF15<sup>-/-</sup>) en cage à métabolisme avec un régime faible en K<sup>+</sup>. Comme attendu, on observe que les souris WT diminuent leur excrétion urinaire de K<sup>+</sup> en réponse à la restriction potassique. Cependant, les souris GDF15<sup>-/-</sup> retardent leur diminution d'excrétion urinaire de K<sup>+</sup>. Entre le 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> jour, les souris GDF15<sup>-/-</sup> perdent donc 30 à 100% plus de K<sup>+</sup> dans les urines comparé aux souris WT [voir **Figure 22 A**]. Ce retard dans l'adaptation rénale se reflète sur la kaliémie des souris GDF15<sup>-/-</sup> qui sont hypokaliémiques (3.3 $\pm$ 0.1 mmol/L) à 4 jours de restriction alors que les souris WT, adaptées, demeurent normokaliémiques (3.9 $\pm$ 0.1 mmol/L) [voir **Figure 22 B**].



**Figure 22 : Conséquences physiologiques de l'absence de GDF15.** (A) Excrétion urinaire de K<sup>+</sup> normalisée par la créatinine urinaire de souris, en régime standard (NK) ou pendant 14 jours de restriction potassique (LK), WT (cercles blancs) ou GDF15<sup>-/-</sup> (cercles noirs). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM, analysés par un test ANOVA à deux facteurs, suivi d'une comparaison multiple (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ). (B) Kaliémie des souris WT (cercles blancs) et GDF15<sup>-/-</sup> (cercles noirs) en régime standard (NK) ou après 4 ou 10 jours de restriction potassique. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM, analysés par un test ANOVA à deux facteurs, suivi d'une comparaison multiple (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

### 3. L'absence de GDF15 altère l'augmentation du nombre de cellules intercalaires de type A

Face au problème de rétention de K<sup>+</sup> des souris GDF15<sup>-/-</sup>, nous nous sommes intéressés aux cellules intercalaires de type A (ICA), car elles interviennent dans la réabsorption de K<sup>+</sup> lors d'un régime faible en K<sup>+</sup> [voir chapitre **Homéostasie du potassium**]. Afin de quantifier le nombre d'ICA nous avons microdisséqué, puis marqué par immunofluorescence l'échangeur anionique 1 (AE1) un marqueur spécifique des ICA, des OMCD de souris WT et GDF15<sup>-/-</sup> lors d'un régime standard ou faible en K<sup>+</sup> [voir **Figure 23 A**]. On observe que le nombre de cellules par millimètre ne change pas en fonction du génotype et du régime des souris [voir **Figure 23 B**]. Cependant, chez les souris WT, le pourcentage d'ICA augmente lors d'un régime faible en K<sup>+</sup>, passant de 20.8 $\pm$ 0.7% lors d'un régime standard à 23.7 $\pm$ 0.6%. Chez les souris GDF15<sup>-/-</sup>, le pourcentage d'ICA ne change pas selon le régime (20.9 $\pm$ 0.4% en régime standard contre 21.2 $\pm$ 0.8% lors d'une restriction potassique) [voir **Figure 23 C**].

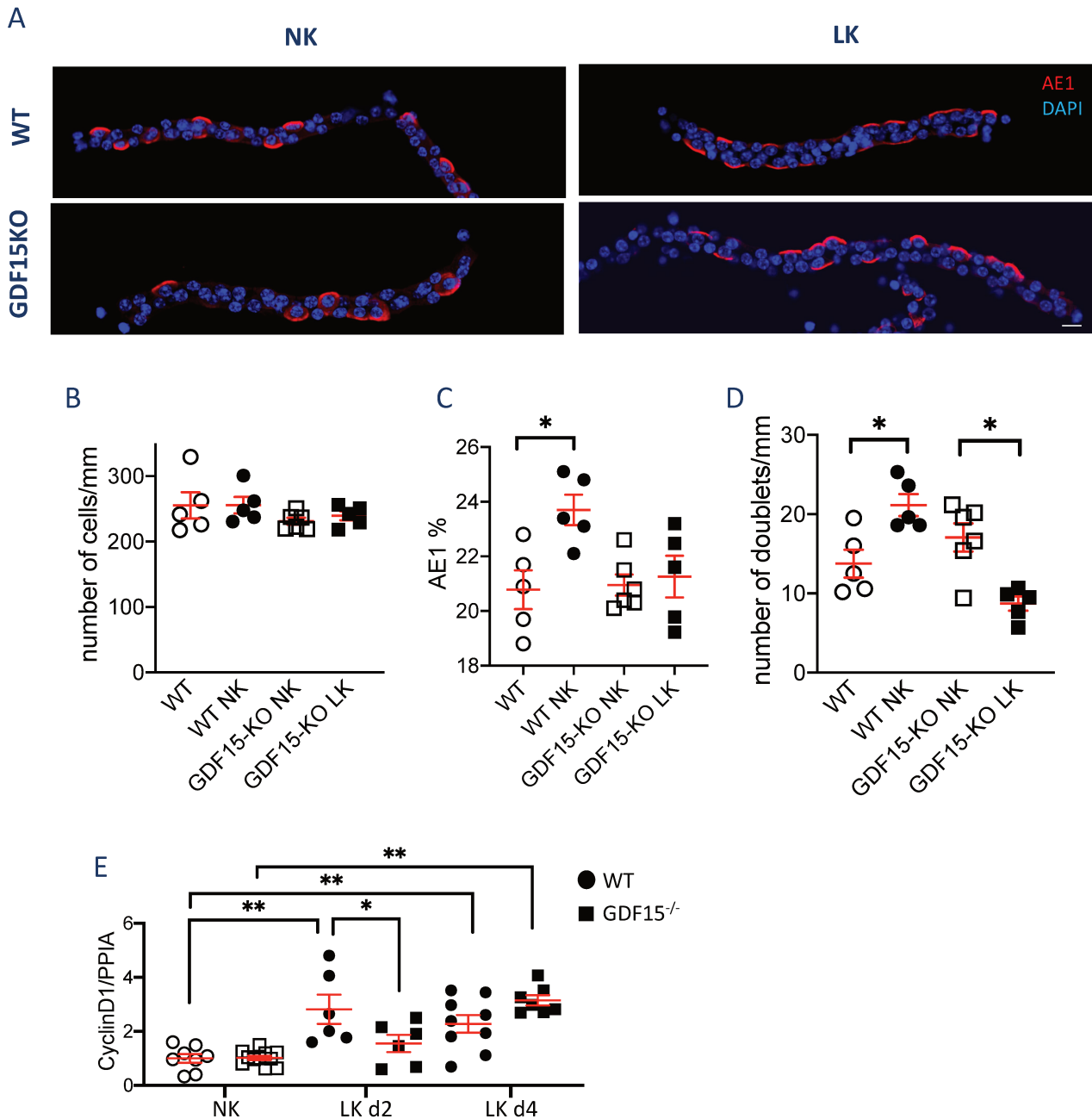
Dans l'épithélium tubulaire, il est défini que deux ICA ne sont jamais côte à côte en condition physiologique. L'observation de deux ICA adjacentes (doublet) est donc le reflet d'une division récente de la cellule ou de la transdifférenciation d'une cellule adjacente en ICA. On observe que lors d'un régime faible en K<sup>+</sup>, le nombre de doublets d'ICA augmente dans les OMCD de souris WT comparé au régime standard (13.8 $\pm$ 1.8 doublets/mm contre 21.1 $\pm$ 1.4 doublets/mm,

respectivement). En revanche, le nombre de doublets d'ICA n'augmente pas chez les souris GDF15<sup>-/-</sup> en restriction potassique [voir **Figure 23 D**]. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression du gène codant la cycline D1, une protéine régulatrice qui intervient dans la prolifération cellulaire dans les OMCD des souris WT et GDF15<sup>-/-</sup> en régime standard et faible en K<sup>+</sup>. On peut voir que lors d'un régime standard, l'expression du gène codant la cycline D1 est similaire chez les deux souches de souris. Elle augmente après 2 jours de restriction potassique chez les souris WT, mais pas chez les souris GDF15<sup>-/-</sup>. Après 4 jours de restriction, l'expression du gène codant la cycline D1 augmente chez les souris WT et GDF15<sup>-/-</sup>, indiquant un décalage dans le processus de prolifération cellulaire en absence de GDF15 [voir **Figure 23 E**].

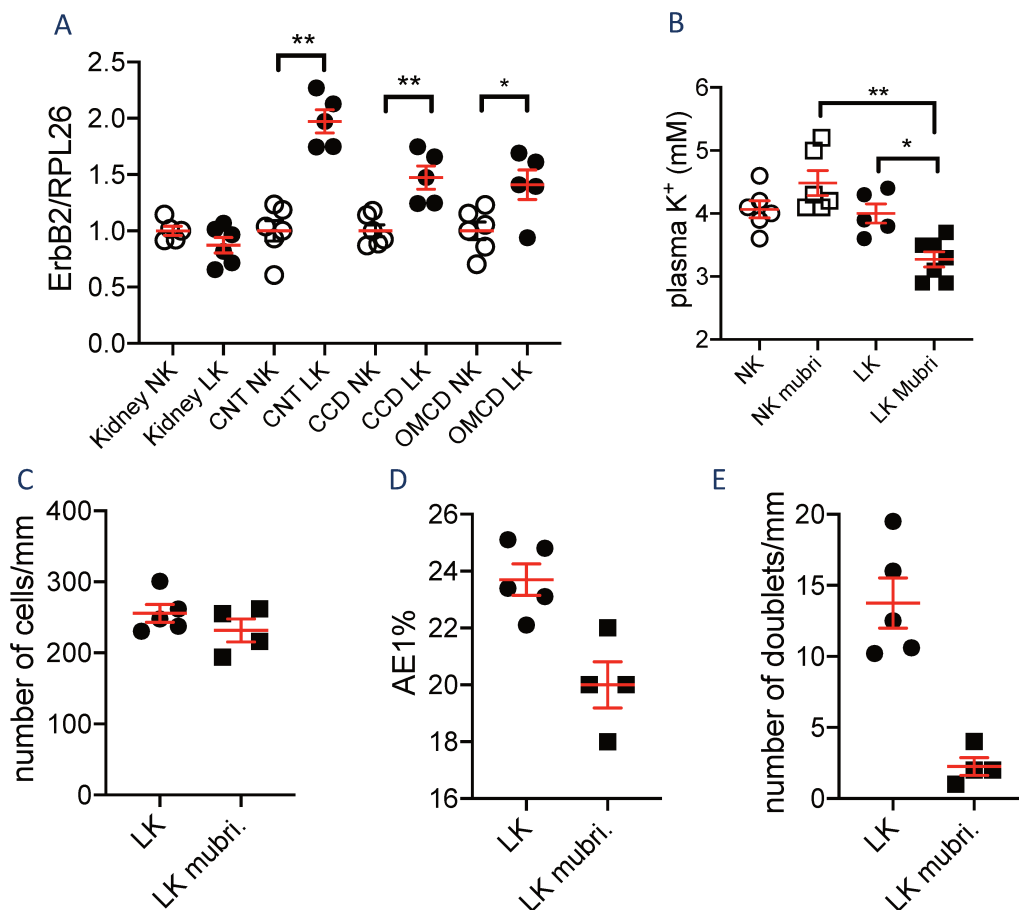
#### 4. Les effets de GDF15 sur l'augmentation du nombre de cellules intercalaires de type A passe par le récepteur ErbB2

Afin d'aller plus loin dans les mécanismes induits par GDF15 en réponse à une restriction potassique, nous nous sommes intéressés au récepteur ErbB2. Comme expliqué **ci-dessus**, GDF15 possède également un autre récepteur, appelé GFRAL, mais ce dernier n'est pas exprimé dans le rein, alors que le récepteur ErbB2 y est exprimé (Cheval *et al.*, 2021). Nous avons donc mesuré l'expression du gène codant le récepteur ErbB2 dans des échantillons de reins totaux, et le long du néphron distal au niveau du canal connecteur (CNT), du canal collecteur cortical (CCD) et du canal collecteur médullaire (OMCD) de souris WT en régime standard ou faible en K<sup>+</sup>. On observe que le gène codant le récepteur ErbB2 est bien exprimé dans le rein, et son expression est augmentée de 50 à 100% dans le néphron distal de souris WT en restriction potassique [voir **Figure 24 A**]. Ceci indique que Erbb2 pourrait être impliqué dans la réponse rénale de GDF15 lors d'un régime faible en K<sup>+</sup>. Nous avons donc testé cette hypothèse en administrant un inhibiteur antagoniste du récepteur ErbB2, le mubritinib, à des souris WT en régime standard ou faible en K<sup>+</sup>. On observe que le mubritinib induit chez les souris WT un phénotype similaire aux souris GDF15<sup>-/-</sup>, soit une hypokaliémie après 4 jours de restriction potassique [voir **Figure 24 B**]. En effet, sans mubritinib les souris WT ont une kaliémie de 4.0±0.2 mmol/L contre 3.3±0.1 mmol/L pour les souris WT traitées. Nous avons donc étudié la prolifération des ICA, on observe que le nombre de cellules par millimètre ne change pas mais le mubritinib bloque l'augmentation du pourcentage d'ICA et la présence de doublets normalement mis en place en réponse à la restriction potassique [voir **Figure 24 C-E**]. La régulation de la plasticité cellulaire du canal collecteur, essentiel à l'adaptation rénale

mis en place en réponse à une restriction potassique, passerait donc par la voie de signalisation GDF15/ErbB2.



**Figure 23 : Étude de la prolifération des cellules intercalaires de type A en réponse à 4 jours de restriction potassique.** (A) Exemples de résultats d'immunofluorescence obtenus au microscope confocal, de canaux collecteurs médullaires (OMCD) de souris WT ou GDF15<sup>-/-</sup>, sous un régime standard ou après 4 jours de restriction potassique. Marquage des noyaux au DAPI (bleu) et de l'échangeur AE1 (rouge). Les acquisitions stack ont été utilisées pour reconstituer les tubules en 3D afin de compter précisément le nombre de noyaux (B), le nombre de cellules AE1 positives, et le pourcentage de cellules AE1 positives formant des doublets (D) chez des souris WT (symboles ronds) ou GDF15<sup>-/-</sup> (symboles carrés), sous un régime standard (NK, symboles blancs) ou après 4 jours de restriction potassique (LK, symboles noirs). Chaque symbole représente la moyenne de 7 à 11 tubules du même animal. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=5-6), analysés par un test Mann-Whitney (\*\*p<0.01). (E) Expression de l'ARNm codant pour la Cycline D1 chez les souris WT (symboles cercles) et GDF15<sup>-/-</sup> (symboles carrés), sous régime standard (NK, symboles blancs) ou après 2 ou 4 jours de restriction potassique (LK, symboles noirs). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM (n=6-10), analysés par un test ANOVA à deux facteurs, suivi d'une comparaison multiple (\*\*p<0.01, \*p<0.05).

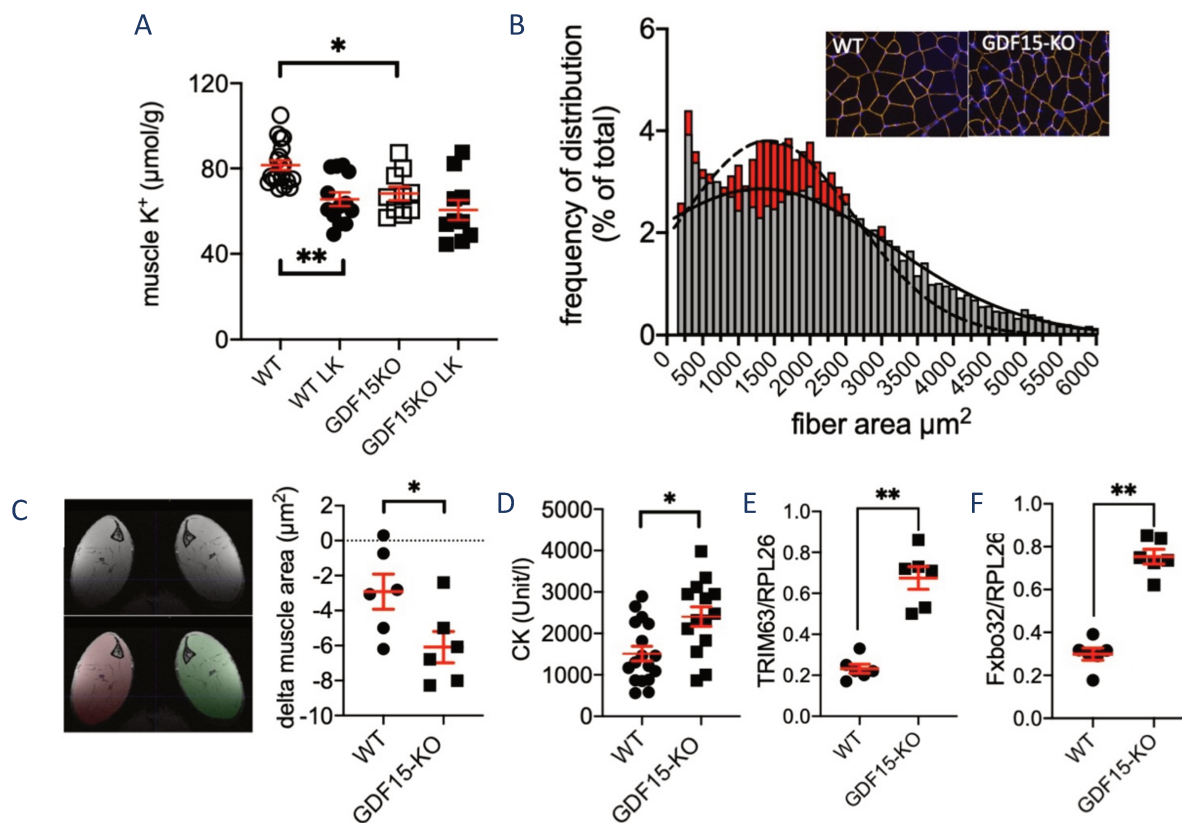


**Figure 24 : Étude du récepteur ErbB2 dans le cadre d'une restriction potassique.** (A) Expression de l'ARNm codant pour le récepteur ErbB2 dans des échantillons de reins totaux, de tubules connecteurs (CNT), de canaux collecteurs corticaux et médullaires (CCD et OMCD). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=5-6$ ), analysés par comparaison de l'effet du régime dans chaque segment indépendamment des autres via un test Mann-Whitney (\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ ). (B) Kaliémie des souris WT lors d'un régime standard (symboles blancs) ou après 4 jours de restriction potassique (symboles noirs), traitées ou non avec du mubritinib. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=5-7$ ), analysés par un test ANOVA à deux facteurs, suivi d'une comparaison multiple (\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ ). Nombre de noyaux (C), de cellules AE1 positives (D) et de doublets de cellules AE1 positives (E) chez des souris après 4 jours de restriction potassique, traitées ou non avec du mubritinib. Chaque symbole représente la moyenne de 7 à 11 tubules du même animal. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=4-5$ ), analysés par un test Mann-Whitney (\*\* $p<0.01$ ).

## 5. L'absence de GDF15 induit des modifications de la structure musculaire en réponse à un régime faible en potassium.

Nous nous sommes intéressés au muscle qui est l'un des acteurs majeurs de l'homéostasie du K<sup>+</sup>, via le stockage musculaire ou la libération de K<sup>+</sup> vers le compartiment extracellulaire. Nous avons d'abord mesuré le contenu en K<sup>+</sup> des muscles gastrocnémiens des souris WT et

GDF15<sup>-/-</sup> en régime standard et après 4 jours de restriction potassique. On observe que lors d'un régime standard, les souris GDF15<sup>-/-</sup> ont déjà 20% de K<sup>+</sup> en moins dans leurs muscles comparé aux souris WT. Suggérant que les souris GDF15<sup>-/-</sup> compensent déjà l'absence de GDF15 en relarguant du K<sup>+</sup> vers le compartiment extracellulaire. Lors d'une restriction potassique, les souris WT diminuent leur contenu musculaire en K<sup>+</sup> passant de 82±2 μmol/g à 66±3 μmol/g, alors que les souris GDF15<sup>-/-</sup> sont incapables de diminuer davantage leur contenu musculaire en K<sup>+</sup> (68±3 μmol/g contre 61±5 μmol/g) [voir **Figure 25 A**]. Nous avons ensuite voulu étudier si la structure musculaire était modifiée en réponse à un régime faible en K<sup>+</sup>. Nous avons pu évaluer la taille des fibres musculaires à l'aide d'un marquage de la lame basale avec un anticorps anti-laminine. On observe que les souris WT présentent des fibres musculaires plus larges que les souris GDF15<sup>-/-</sup> (2148±15 μm<sup>2</sup> contre 1706±11 μm<sup>2</sup>, respectivement) [voir **Figure 25 B**]. Afin d'étudier la structure musculaire de manière précise, la surface des muscles des membres postérieurs des souris WT et GDF15<sup>-/-</sup> en régime standard ou après 4 jours de restriction potassique a été mesurée par imagerie RMN. On observe que les souris GDF15<sup>-/-</sup> ont une surface musculaire environ 2 fois plus réduite que les souris WT en réponse à 4 jours de restriction potassique [voir **Figure 25 C**]. Face à ces modifications musculaires, nous avons mesuré des marqueurs de dégradation musculaire et avons observé que, lors d'une restriction potassique, la créatine kinase est plus élevée chez les souris GDF15<sup>-/-</sup> comparé aux souris WT [voir **Figure 25 D**]. De plus, les gènes associés à l'atrophie musculaire, Trim63 et Fxbo32, sont également plus élevés dans ce contexte chez les souris GDF15<sup>-/-</sup> [voir **Figure 25 E-F**]. Ces résultats observés suggèrent que les souris GDF15<sup>-/-</sup> perdent du muscle en réponse à un régime faible en K<sup>+</sup>, alors que les souris WT capables de relarguer du K<sup>+</sup> conservent l'intégrité de leurs muscles. En absence de GDF15, le muscle n'est plus capable de répondre correctement à une restriction potassique.



**Figure 25: Analyses des muscles de souris en réponse à une restriction potassique.** (A) Concentration en  $K^+$  des gastrocnemius des souris WT (cercles) et  $GDF15^{-/-}$  (carrés) en régime standard (NK, symboles blancs) et après 4 jours de restriction potassique (LK, symboles noirs). Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=10-20$ ), analysés par un test ANOVA à un facteur, suivi d'une comparaison multiples des moyennes (\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ ). (B) Fréquence de distribution des aires des fibres musculaires des quadriceps de souris WT (histogrammes gris, trait plein) et  $GDF15^{-/-}$  (histogrammes rouges, trait pointillés) après une restriction potassique de 4 jours.  $n=3$ , 2 coupes par souris et 8197 et 8734 fibres analysées pour les souris WT et  $GDF15^{-/-}$ , respectivement. (C) Exemple d'une image RMN des muscles postérieurs de souris WT en restriction potassique. Les régions colorées correspondent à la région d'intérêt, utilisées pour l'analyse de la surface musculaire. Les mesures ont été effectuées chez des souris WT (cercles noirs) et  $GDF15^{-/-}$  (carrés noirs) en régime standard ou après 4 jours de restriction potassique. La différence de surface a été mesurée entre le régime standard et après la restriction potassique pour un même animal. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), analysés avec un test T de Student, non pairé (\* $p<0.05$ ). (D) Concentration de la créatine kinase (CK) plasmatique des souris WT (cercles) et  $GDF15^{-/-}$  (carrés) après 4 jours de restriction potassique. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=14$ ), analysés avec un test T de Student, non pairé (\* $p<0.05$ ). (E) et (F) Analyse de l'expression ARNm des gènes *Trim63* et *Fxo32*, respectivement, dans des muscles de souris WT (cercles noirs) et  $GDF15^{-/-}$  (carrés noirs) après 4 jours de restriction potassique. Les résultats sont représentés avec  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), analysés avec un test T de Student, non pairé (\*\* $p<0.01$ ).



## IV. Discussion et conclusion

GDF15 est faiblement exprimé en conditions physiologiques mais son expression augmente en réponse à différents stress. Parmi ses différents rôles physiologiques, il a été démontré que GDF15 était un facteur anorexigène qui induit une diminution de prise alimentaire et une perte de poids (Chrysovergis *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2017). Il est intéressant de noter que le vieillissement et la cachexie peuvent également induire la production de GDF15, ce qui peut déclencher un cercle vicieux avec une diminution de l'appétit, aggravant la cachexie (Jones *et al.*, 2018; Hale and Véniant, 2021). GDF15 est également décrit comme un facteur jouant un rôle dans le cadre de l'obésité, limitant l'apport et le stockage d'énergie. En plus de ces effets métaboliques, GDF15 est également étudié comme un marqueur de la progression des tumeurs cancéreuses avec le potentiel d'être utilisé comme un biomarqueur (Wischhusen, Melero and Fridman, 2020). Concernant le rein, il a été démontré que GDF15 possède un rôle néphroprotecteur permettant la régulation de la production de la matrice extracellulaire et l'entrée en prolifération des cellules épithéliales tubulaires (Nair *et al.*, 2017). Il permet notamment de limiter les lésions tubulaires dans des modèles murins de diabète de type 1 et de type 2 (Mazagova *et al.*, 2013) [voir le chapitre **Le facteur de croissance GDF15**, pour plus de détails].

### 1. **GDF15 régule la réponse rénale à un régime faible en potassium**

Nous avons récemment rajouté à cette liste l'implication de GDF15 dans le contrôle de la balance ionique. En effet, il a été démontré que l'expression de GDF15 était augmentée dans les canaux collecteurs de souris lors d'une acidose métabolique, et induisait une prolifération des cellules intercalaires de type A (Cheval *et al.*, 2021). Pour rappel, dans ce contexte, GDF15 est produit par les cellules principales et active le récepteur ErbB2 exprimé au niveau des cellules intercalaires de type A, provoquant l'entrée en prolifération de celles-ci [voir le chapitre **Voies de signalisations** de GDF15, pour plus de détails].

Nous avons démontré dans cette étude, que l'expression de GDF15 était également augmentée le long du néphron, de l'iléum et du colon, conduisant à une élévation de GDF15 dans le plasma et les urines de souris en restriction potassique. Dans les échantillons d'urines issus de volontaires sains, d'une précédente étude, nous n'avons pas mesuré d'élévation significative de GDF15 lors d'un passage à un régime faible en K<sup>+</sup>. En revanche, nous avons pu observer une corrélation entre l'excrétion urinaire de GDF15, qui représente de manière indirecte sa production, et la kaliémie des volontaires sains lors d'une restriction potassique. Cette corrélation suggère que les sujets qui réussissent à maintenir une kaliémie normale en réponse

à un régime faible en  $K^+$  sont ceux qui produisent le plus de GDF15. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires afin de mieux caractériser le rôle de GDF15 chez l'humain dans ce contexte. En effet, dans cette expérience les volontaires sains, sans restriction potassique, présentaient déjà des apports faibles en  $K^+$  (environ 2g/jour) si l'on compare aux recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) qui est de consommer au minimum 3.5g de  $K^+$  par jour. De plus, la restriction potassique induite n'a fait que diminuer de 2 fois (environ 1g/jour) leurs apports. Ainsi, deux raisons pourraient alors expliquer pourquoi nous n'observons pas de différence significative de l'expression de GDF15. 1/ L'expression de GDF15 est déjà élevée et n'augmente pas plus lorsqu'on diminue les apports en  $K^+$ . 2/ Un autre mécanisme GDF15-indépendant s'est mis en place en réponse aux carences potassiques chroniques. Il serait alors intéressant d'augmenter les apports des volontaires sains jusqu'à atteindre les recommandations d'environ 3.5g / jour, avant de passer à un régime faible en  $K^+$ . Dans la suite de cette étude, nous avons démontré que l'absence de GDF15 induit un problème d'adaptation rénale. Le rein n'est plus capable de retenir le  $K^+$  correctement, et cette fuite de  $K^+$  dans les urines induit une hypokaliémie des souris GDF15<sup>-/-</sup> en restriction potassique. Nous avons mis en évidence que ce problème d'adaptation était dû à un problème d'augmentation du nombre des cellules intercalaires de type A. Il reste cependant à définir s'il s'agit d'un problème de prolifération ou de transdifférenciation des cellules principales en cellules intercalaires de type A. Dans le cadre d'une acidose métabolique, il a été démontré par notre laboratoire qu'il s'agissait d'une entrée en prolifération de ces cellules (Van Huyen *et al.*, 2008; Cheval *et al.*, 2021). Cependant, il a également été démontré dans la littérature que les cellules principales étaient capables de se transdifférencier en cellules intercalaires de type A (Park, 2012; Iervolino *et al.*, 2020). Dans le cadre de notre étude, l'apparition de cellules intercalaires côte à côte (doublets) et de manière GDF15-dépendante lors d'une restriction potassique suggère une entrée en prolifération de ces cellules. Lors d'une transdifférenciation cellulaire, on peut imaginer un stade où la cellule exprime à la fois des marqueurs des cellules principales et des marqueurs des cellules intercalaires de type A donc il serait intéressant de l'étudier par immunofluorescence. Une approche plus globale serait d'utiliser la technique de single cell RNAseq, où il serait possible de distinguer les populations de cellules principales « pures », de cellules intercalaires de type A « pures » et des cellules en transdifférenciation présentant un phénotype intermédiaire.

Afin d'aller plus loin dans les mécanismes induits par GDF15, nous avons démontré que l'augmentation du nombre de cellules intercalaires de type A passait par le récepteur ErbB2. Ce résultat vient confirmer le rôle de GDF15 dans la littérature indiquant qu'il est responsable

de la prolifération tumorale *via* le récepteur ErbB2 [pour plus de détails voir le chapitre **GDF15 et cancer**]. Il a également été démontré que GDF15 immunoprécipitait avec le récepteur ErbB2 (Li *et al.*, 2018). Cependant, il reste à définir si GDF15 lie directement le récepteur ErbB2, ou s'il l'active de manière indirecte.

## 2. Les effets extrarénaux de GDF15 en réponse à une restriction potassique

Pour rappel, nous avons observé que l'augmentation de l'expression de GDF15 n'est pas limitée aux reins, mais augmente aussi au niveau de l'iléum et du côlon des souris en restriction potassique. Ces observations confirment des études récentes qui démontraient l'élévation de l'expression de GDF15 dans ces deux zones du système digestif en réponse à un traitement anti-diabétique, la metformine (Day *et al.*, 2019; Coll *et al.*, 2020). Il a été clairement établie dans la littérature que l'intestin possède la capacité de détecter la quantité de  $K^+$  dans le bol alimentaire et de sécréter en réponse des facteurs permettant de réguler de manière rapide l'excrétion urinaire de  $K^+$ , sans modification préalable de la kaliémie (Youn, 2013). Cependant, les facteurs impliqués permettant d'agir sur l'excrétion rénale de  $K^+$  n'ont pas encore été identifiés. Nous pensons que GDF15 est l'un des facteurs produit par l'intestin et qui permet notamment d'induire une rétention rénale de  $K^+$  en réponse à un régime faible en  $K^+$  afin d'éviter l'hypokaliémie.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude du muscle qui intervient également dans l'homéostasie du  $K^+$  contribuant au maintien d'une kaliémie dans des valeurs physiologiques [pour plus de détails, voir le chapitre **La balance interne de l'homéostasie potassique**]. Des études ont démontrées une production musculaire de GDF15 dans différents contextes impliquants les muscles, comme à la suite d'un exercice physique ou lors du syndrome de cachexie (Jones *et al.*, 2018; Laurens *et al.*, 2020). Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différences significatives concernant l'expression de GDF15 dans les muscles des souris après une restriction potassique de 4 jours. Cependant, la tendance observée suggère qu'il serait intéressant d'analyser l'expression musculaire de GDF15 en augmentant la durée du régime faible en  $K^+$ . Nous avons démontré par la suite que les souris GDF15<sup>-/-</sup> ont une concentration musculaire de  $K^+$  plus faible lors d'un régime standard, et ne sont pas capables de la diminuer davantage lors d'un régime faible en  $K^+$ . Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'une baisse trop importante de la concentration intracellulaire de  $K^+$  induit une hyperpolarisation de la membrane plasmique conduisant à l'activation de la sécrétion de  $Cl^-$ , responsable de la plasmolyse puis de l'entrée en apoptose des cellules (Yu, 2003). Nous avons d'ailleurs observé par RMN une perte de surface musculaire plus importante chez les souris GDF15<sup>-/-</sup> en réponse à une restriction potassique. Cette réduction de la surface musculaire plus importante chez les

souris knock-out semble résulter d'une baisse du volume des fibres musculaires mais aussi de la dégradation des fibres comme le montre l'élévation des facteurs de souffrance musculaire Fxbo32 et Trim63. Les souris GDF15<sup>-/-</sup> compensent, l'incapacité à relarguer du K<sup>+</sup> musculaire, par la dégradation des fibres musculaires mais cela reste inefficace, car les reins des souris GDF15<sup>-/-</sup> ne retiennent pas efficacement le K<sup>+</sup>.

En conclusion, ces résultats indiquent que GDF15 est un acteur majeur dans l'adaptation rénale à une restriction potassique et son absence induit des mécanismes compensateurs qui mènent à l'atrophie musculaire.

## **V. Article du projet**

### **GDF15 mediates renal cell plasticity in response to potassium depletion**

Samia Lasaad<sup>1,2</sup>, Christine Walter<sup>1,2</sup>, Chloé Rafael<sup>1,2</sup>, Luciana Morla<sup>1,2</sup>, Alain Doucet<sup>1,2</sup>, Nicolas Picard<sup>3</sup>, Anne Blanchard<sup>1,2,4</sup>, Yves Fromes<sup>5</sup>, Béatrice Matot<sup>5</sup>, Gilles Crambert<sup>1,2#</sup> and Lydie Cheval<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université Paris Cité, Laboratoire de Physiologie Rénale et Tubulopathies, F-75006 Paris, France

<sup>2</sup>CNRS EMR 8228 – Unité Métabolisme et Physiologie Rénale, F-75006, Paris, France

<sup>3</sup>Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, UMR 5305 CNRS, University Lyon 1, Lyon, F-69367, France

<sup>4</sup>Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Centre d'Investigation Clinique, Paris, France

<sup>5</sup>NMR Laboratory, Neuromuscular Investigation Center, Institute of Myology, Paris, France

# To whom correspondence should be sent

Gilles CRAMBERT, Ph.D

Centre de Recherche des Cordeliers

Laboratoire de Physiologie Rénale et Tubulopathies

15 rue de l'Ecole de Médecine

75270 Paris cedex

Phone: 00 33 1 44 27 50 21

Fax : 00 33 1 46 33 41 72

e-mail : [gilles.crambert@crc.jussieu.fr](mailto:gilles.crambert@crc.jussieu.fr)

The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Article soumis le 19 Décembre 2022 à JCI insight**

## **Abstract**

A low potassium ( $K^+$ ) intake is a common situation in the population of the Westernized countries where processed food is prevalent in the diet. Here, we show that expression of GDF15, a TGF $\beta$ -related growth factor, is increased in renal tubular segments and gut parts of mice in response to low- $K^+$  diet leading to a systemic elevation of its plasma and urine concentration. In human, under mild dietary  $K^+$  restriction, we observed that urine GDF15 excretion is correlated with plasma  $K^+$  level. Conversely to WT mice, adaptation to  $K^+$  restriction of GDF15-KO mice is not optimal, they do not increase their number of type A intercalated cell, responsible for  $K^+$  retention, and have a delayed renal  $K^+$  retention, leading to early development of hypokalemia. This renal effect of GDF15 depends on ErBb2 receptor, whose expression is increased in the kidney collecting ducts. We also observe that, in the absence of GDF15, the release of  $K^+$  by the muscles is blunted which is compensated by a loss of muscle mass. Thus, in this study, we showed that GDF15 plays a central role in the response to  $K^+$  restriction by orchestrating the modification of the cell composition of the collecting duct.

**198 words**

## Introduction

The modern Western diet is characterized by consumption of processed food with high intakes of proteins, high-fat dairy products and high-sugar drinks correlating with development of metabolic disorders (diabetes, obesity). This type of diet has also strong but often underappreciated consequences on the electrolyte balances. Indeed, modern human eating typical Western diet produces approximately 50 mmol of acid/day whereas our ancestors were considered to be net base producers (1). In parallel, the consumption of salt (NaCl) and potassium ( $K^+$ ) have been completely modified, switching from a rich- $K^+$ /low NaCl diet in the hunter-gatherer population to the opposite in the modern, westernized population (2). In a recent study, we showed that the median daily  $Na^+$  and  $K^+$  intakes in young Parisian males are 136 mmol and 57 mmol/day, respectively (3) which are far from the recommended values by the dietary reference intakes (maximal  $Na^+$  intake 65 mmol/day and minimal  $K^+$  intake 120 mmol/day). Fortunately, we have the ability to cope with these changes that occurred very recently in our eating habits thanks to our kidneys. However, these long-term dietary modifications may also contribute to the development of diseases such as hypertension (4) and are correlated with higher risk of mortality (5) when they encounter favorable genetic background with polymorphisms that would have remained silent under more “natural” diet. The lack of  $K^+$  in the diet is a situation well-known to induce a global adaptation involving coordinated regulatory processes (6). The ability of muscle to release  $K^+$  (internal balance) is of particular importance for rapidly modulating the plasma  $K^+$  concentration (7). In parallel, the kidney decreases its ability to secrete  $K^+$  (through the inhibition of  $K^+$  channel ROMK, for review see (8)) and activates  $K^+$  retention pathways through a progesterone-dependent stimulation of the H,K-ATPase type 2 (9) and the increase of the number of A-type intercalated cells (AIC) in collecting duct (10, 11).

The cellular plasticity of the collecting duct is a fascinating process allowing the kidney to modify its structure to respond to ionic stress through mechanisms involving either transdifferentiation from another cell type of the collecting ducts and/or direct cell proliferation. Our group has identified that the growth differentiation factor 15 (GDF15) triggers the proliferation of AIC in response to acidosis (12, 13). GDF15 is a peptide belonging to the TGF $\beta$  family which has been reported to have multiple physiological effects (14). Regarding the renal production of GDF15, in addition to the collecting duct, as mentioned above, it has also been established that it is produced by a subset of proximal tubule cells in mice mimicking Cockayne

syndrome (15). It is now strongly suggested that GDF15 is a sentinel mediator (16) that responds to stress situation involving mitochondrial defects (17-19) and is found increased in the circulation and urine following many pathological states, mainly in cancer. GDF15 is also involved in the control of energy metabolism, being overexpressed in obese condition (20, 21) and having anorectic properties (22, 23). GDF15 is also found increased in aging (24) where it could protect against inflammation and tissue injury but also to muscle wasting at this stage. Interestingly, GDF15 has also been identified as one of the most upregulated genes in kidney collecting ducts in response to dietary K<sup>+</sup>-restriction (10) but its role in this particular situation was yet unknown. In this study, we show that GDF15 plays a central role in the control of the K<sup>+</sup> balance by adapting the cell composition of the collecting duct and found that the inability to increase AIC, as observed in GDF15-KO mice, leads to loss of muscle volume.



## Results

### **GDF15 level is increased in response to dietary K<sup>+</sup>-restriction**

We showed that urine GDF15 is increased (Figure 1A) by K<sup>+</sup> restriction following a kinetic that ends to a plateau at day 3-4. At this plateau, the level of GDF15, normalized to the creatinine, is 3-time higher than in control diet (877±104 ng/mmol at day 4 vs 310±25 ng/mmol in control diet). In parallel, the level of GDF15 in the plasma (Figure 1B) is also 2-time higher in mice under low-K<sup>+</sup> diet for 4 days than in control diet (140±14 vs 69±2 pg/ml, respectively) indicating that the stimulation of GDF15 is more systemic than previously envisaged. As shown in the Figure 1C, the expression of GDF15 is increased to a different extent in all nephronic segments from mice under low-K<sup>+</sup> diet. Since the stimulation of GDF15 is more systemic than previously envisaged, we therefore extend our investigation to muscle tissues and intestine which are known to be involved in K<sup>+</sup> metabolism. As shown in Figure 1D, we measured the tissue content of GDF15 by ELISA analysis and we showed that it is significantly increased in the ileum and the colon of mice under K<sup>+</sup> restriction but not in muscle.

To investigate whether this link between GDF15 and dietary K<sup>+</sup> restriction is also present in human, we used urine samples obtained in a former study where healthy young men were K<sup>+</sup>-depleted for one week (3). As shown in Figure 2A, the dietary intervention slightly but significantly decreased the plasma K<sup>+</sup> level from 3.7±0.1 mM to 3.35±0.09 mM (p=0.039). When we analysed and compared the urine excretion of GDF15 in these subjects under normal diet or after a week of K<sup>+</sup>-depletion, we did not observe any significant difference (Figure 2B). Taking a closer look at the relationship between the presence of GDF15 in urine and the plasma K<sup>+</sup> level of the different subjects, we found that under normal K<sup>+</sup> diet, there was no correlation (Figure 2C). However, after dietary K<sup>+</sup> restriction the urine excretion of GDF15 is significantly correlated to the plasma K<sup>+</sup> level (Figure 2D).

### **GDF15 is involved in the increase of AIC observed in response to LK diet**

To quantify the increase of AIC number, we used a simple method consisting in isolation of medullary collecting ducts and labelling of the anion exchanger 1, a specific marker of the AIC (25) (Figure 3A). As shown in Figure 3B, the number of cells/mm is neither modified by the K<sup>+</sup>-restriction period nor by the absence of GDF15 (GDF15-KO). However, the percent of AE1<sup>+</sup> cells increased from 20.8±0.7% in control diet to 23.7±0.6% (p<0.05) in WT mice (Figure 3C). In GDF15-KO mice, the percent of AIC under control condition is similar to that in WT mice and did not increase in LK diet condition (20.9±0.4% vs 21.2±0.8%, respectively).

A characteristic of AIC is to be completely isolated in the tubular epithelium, the observation of two adjacent cells (doublet) is therefore the trace of a recent cell division. As shown in Figure 3D, the number of AIC doublets was significantly increased by LK diet in WT mice ( $13.8 \pm 1.8$  doublets/mm and  $21.1 \pm 1.4$  doublets/mm, respectively,  $p < 0.05$ ). In GDF15-KO mice, the number of doublets is similar than in WT mice under control condition and did not increase after 4 days of LK diet. The expression of Cyclin D1 a gene involved in cell proliferation was then followed in isolated OMCD of WT and GDF15-KO mice under either control diet or 2 and 4 days of LK diet. As shown in Figure 3E, cyclin D1 expression in OMCD is similar in both mouse strains but is significantly increased after 2 days of LK diet in WT ( $p < 0.01$ ) but not in GDF15-KO mice indicating a delay in cell division rates in the absence of GDF15. Four days after LK, both genotypes expressed the same amount of cyclin D1 in their OMCD.

### **GDF15 participates in the renal adaptation to $K^+$ -restriction through an ErbB2-dependent mechanism**

To appreciate the involvement of GDF15 in the renal adaptation to a low- $K^+$  diet and the physiological consequences of the lack of AIC proliferation, we investigated the renal adaptation to a low- $K^+$  diet. The physiological parameters of WT and GDF15-KO mice were reported in Table 1 and showed that prolonged LK diet induced a decrease of weight and food intake in WT that is less pronounced in GDF15-KO mice. Urine volume increased in both genotypes. Measurement of the urine  $K^+$  excretion of WT and GDF15-KO mice in response to a LK diet (Figure 4A) showed that the absence of GDF15 induced a delayed in the reduction of  $K^+$ -excretion. Thus, at day 1, 2 and 3 of the  $K^+$ -restriction period, the GDF15-KO mice lose between 30 to 100% more  $K^+$  than WT mice. As shown in Figure 4A *inset*, this delayed renal response has a consequence on the plasma  $K^+$  level at day 4 of the LK diet, with GDF15-KO mice becoming hypokalemic ( $3.3 \pm 0.1$  mM) compared with the control mice ( $4.3 \pm 0.2$  mM,  $p < 0.01$ ). On the contrary, WT mice remained with a normal plasma  $K^+$  value ( $3.9 \pm 0.1$  mM) not different from that measured in control diet ( $4.1 \pm 0.1$  mM). The classical receptor for GDF15 is GFRAL that mediates most of its central nervous effect and metabolic effects (for review, see (26)). However, this receptor is not present in the kidney (25) but we have recently identified that ErbB2 receptor, another receptor of GDF15 was present in the kidney (25). In Figure 4B, we measured ErbB2 expression in whole kidney and isolated segments of the distal nephron from the connecting tubules (CNT) to the cortical (CCD) and medullary collecting duct (OMCD). We observed that ErbB2 is not modified by a LK diet at the level of whole kidney analysis but is significantly increased in the distal nephron by 50-100% in response to  $K^+$ -

restriction. This indicates that ErbB2 may be involved in the renal response to K<sup>+</sup>-restriction of GDF15. We tested that hypothesis by treating WT mice under control or LK diet for four days with an antagonist of ErbB2, the mubritinib. As shown in Figure 4C, mubritinib treatment did not modify the number of cell/mm but impeded the LK diet-dependent increase of AIC (Figure 4D-E). Interestingly, the absence of ICA proliferation under a low-K<sup>+</sup> diet impedes a correct adaptation since we showed that if mubritinib alone did not impact the plasma K<sup>+</sup> level of mice under control diet, it reduced the plasma K<sup>+</sup> values of WT mice under LK diet (non-treated mice 4.0±0.2mM vs treated mice 3.3±0.1 mM, p<0.05, Figure 4F). The regulation of cell plasticity in collecting ducts by a GDF15/ErbB2 axis could therefore be an important process to adapt to a dietary K<sup>+</sup> restriction.

### **The absence of GDF15 induces modification of muscle structure in response to K<sup>+</sup> restriction**

Since muscles participate in the K<sup>+</sup> balance by releasing their intracellular K<sup>+</sup> into the extracellular compartment, we first measured the muscle K<sup>+</sup> contents of the WT and GDF15-KO mice under normal or K<sup>+</sup> depleted conditions.

As shown in Figure 5A, under normal conditions, muscles (gastrocnemius) of WT mice contained 20% significantly more K<sup>+</sup> than those from GDF15-KO mice. This result suggests that the GDF15-KO mice already compensate the lack of this factor by releasing muscle K<sup>+</sup>. As expected, the muscle K<sup>+</sup> content is significantly decreased in WT mice after 4 days of K<sup>+</sup> restriction compared to normal condition (66±3 vs 82±2 μmol/g, respectively). Conversely, GDF15-KO mice that have already a low muscle K<sup>+</sup> content under normal condition are unable to decrease it (68±3 vs 61±5 μmol/g). We then investigated whether the muscle structure was modified in response to K<sup>+</sup> restriction and found that, in this condition, WT muscles have larger fibres than GDF15-KO mice (2148±15 μm<sup>2</sup> and 1706±11 μm<sup>2</sup>, respectively, Figure 5B). To confirm that K<sup>+</sup> restriction differently impacts muscle structure in WT and GDF15-KO mice, NMR imaging of hindlimbs have been carried out to precisely measure the size of the muscles. As shown in Figure 5C, the difference of size in the same animals between normal K<sup>+</sup> condition and 4 days of K<sup>+</sup> restriction indicated that the size of GDF15-KO mice is 2-times more reduced compared to WT mice. These two results (laminin labelling and NMR imaging) strongly suggest that GDF15-KO mice loose muscle in response to K<sup>+</sup> restriction whereas WT mice, that have the ability to release K<sup>+</sup> from their muscles, maintain their muscle integrity. We, therefore, measured markers of muscle degradation and showed that plasma creatine kinase is more elevated in GDF15-KO mice compared to WT mice (Figure 5D). In addition, the muscle

expression of two genes related to muscle atrophy, TRIM63 and Fxbo32 (27), was found strongly upregulated under low-K<sup>+</sup> in GDF15-KO mice diet compared to WT mice (Figure 5E-F).

## **Discussion**

GDF15 is generally expressed at a low level under normal/healthy conditions whereas its plasma concentration or urine excretion increase significantly in front of different stresses that generally involve mitochondria dysfunction (28-30). Among its different roles that have been demonstrated (for review see (14)), its action as an anorectic factor that induces loss of food intake and weight is of major importance (31, 32). Interestingly, aging and cachexia can also induce GDF15 production (33) that may trigger a vicious circle, leading to decrease of appetite which, then, aggravates the situation. GDF15 is also described as a factor that plays a role as negative feedback in response to obesity, limiting energy intake and storage (for review, see (34)). In addition to these global metabolic effects, GDF15 also became a marker of solid cancer tumor progression with the potential to be used as a prognostic factor (for review (35)). Regarding kidney, GDF15 has been recently identified in chronic kidney disease as pro-cachectic factors (36) and treatment of mice with GDF15 peptide following unilateral ureter obstruction decreases renal fibrosis (37).

### **GDF15 regulates renal ion excretion**

We recently added to this list of functions, the involvement of GDF15 in the control of ionic balances. Indeed, we described that GDF15 expression was strongly increased in kidney collecting ducts in response to acid load (12) and showed that it controls the proliferation rate of AIC in this situation (13). The mechanism of this system was recently elucidated, showing that GDF15 was produced by the principal cells through a vasopressin-dependent pathway and then could activate directly or not ErbB2 receptor on AIC to trigger cell division (25). In the present study, we showed that GDF15 expression by collecting duct is not specific of metabolic acidosis but is also induced by K<sup>+</sup> restriction and was more systemic, with increased expression in all renal segments and different gut parts, leading to an increase of the urinary and the circulating levels of GDF15. Using samples from a recent study where we tested the adrenal response of healthy volunteers to a mild decrease of K<sup>+</sup> intake (3), we did not measure a significant increase of GDF15 in the urine of the participants which may be due to the fact that we only moderately decrease the K<sup>+</sup> intake by a factor 2. However, this challenge was sufficient to show that both urine GDF15 and the plasma K<sup>+</sup> level of the participants were correlated. Interestingly, in the K<sup>+</sup> depleted group, the individuals that maintain a normal K<sup>+</sup> value were those that had elevated urine GDF15 levels, indicating that the ability to increase GDF15 could protect against hypokalemia. Further investigation with an increased number of volunteers

would be required to better define the role of GDF15 in human, but this result already confirms the involvement of GDF15 in the  $K^+$  balance in human too.

Acidosis and  $K^+$  restriction are well known conditions leading to increase the number of AIC. There are evidences in the literature for an increase of the proliferation rate of these cells in both conditions (10, 13, 25, 38) but also for interconversion from one type of cell (principal or ICB) into ICA (39-41). Here, we cannot definitively conclude for the involvement of GDF15 in one mechanism or another, but we believe that the apparition of doublets of ICA and their reduction in its absence rather plead for a role in the proliferation of ICA. The absence of GDF15 impedes the increase of ICA number in response to  $K^+$  restriction, by a mechanism that, as in acidosis (25), involves ErbB2 receptor. In most of the peripheral tissues such as kidneys, the GDF15 receptor GFRAL is absent (42), indicating that the peripheral action of this factor must be transduced by another receptor. Whether GDF15 directly binds to ErbB2 receptor remains to be clearly establish, however, it has already been involved in the activation of this receptors in different types of cancer (43-45) where it promotes cell proliferation and pErbB2 was successfully immunoprecipitated with GDF15 (46). The consequences of this inadaptation are a loss of  $K^+$  in the urine and a rapid decrease of the plasma  $K^+$  level, indicating that GDF15-mediated AIC proliferation is of major importance in response to  $K^+$  restriction.

### **Extrarenal role of GDF15 in response to $K^+$ depletion**

The finding that induction of GDF15 is not restricted to a particular renal segment but also to gut parts is in good agreement with the recent observation that after treatment with metformin, an anti-diabetic drug (47) the source of GDF15 was the ileum and the distal colon (48). There are also many examples showing that muscle produces GDF15 in different contexts such as exercise (49) or cachexia (33). In our experiments, after 4 days of dietary  $K^+$  restriction, the expression of GDF15 by muscles was not significantly increased but the tendency we observed suggest that further experiments should be performed to investigate whether the duration of the diet could influence the response of this tissue.

It is known for years that the gut has the ability to sense  $K^+$  content and may release factors that permit to rapidly adapt the urine  $K^+$  excretion without any modification of the plasma  $K^+$  level. The elegant works, mainly by JH Youn and AA McDonough, using the “ $K^+$ -clamp” technic were recapitulated in (50) and clearly established the concept of feedforward control of the  $K^+$  balance. At that time, the proposed factors involved in the feedforward control system were not formally identified and were supposed to “inform” the kidney in a situation of  $K^+$  loading to increase its excretion in the urine. We propose that this system, through GDF15, may also

contribute to activate renal  $K^+$  retention mechanisms to prevent a drop in plasma  $K^+$  level in case of low  $K^+$  intake.

Muscles also contribute to maintain a normal plasma  $K^+$  value by releasing intracellular  $K^+$  (6, 51) through the regulation of Na,K-ATPase isoforms (52). However, GDF15-KO mice have a low muscle  $K^+$  content at baseline and seems not able to reduce it even lower. Instead, we observed that GDF15-KO mice decreased their muscle volume through a GDF15-independent mechanisms. A simple explanation is that a low intracellular  $K^+$  concentration is associated to cell death (53), because it would hyperpolarize the membrane and activates  $Cl^-$  secretion, cell shrinkage and ultimately apoptosis. Therefore, in GDF15-KO mice, since their level of intracellular  $K^+$  is already low, the release of  $K^+$  from muscle cells, as expected in response to  $K^+$  restriction, rapidly leads to muscle cell shrinkage and destruction. In our study, we cannot distinguish between cell shrinkage and cell death to explain the decrease of muscle volume, but probably both processes are involved since we observed the presence of markers of muscle lysis. The muscle lysis is inefficient to maintain the plasma  $K^+$  value in a normal range since the kidneys of GDF15-KO mice do not retain it efficiently. Therefore, this is an example where the absence of GDF15 leads to a loss of muscle whereas GDF15 is in, other circumstances, described as a muscle atrophic factor (15, 36).

Altogether, GDF15 appears to be a factor that control plasma  $K^+$  level by regulating the renal cell plasticity. Its absence inducing a compensatory mechanism that leads to muscle atrophy.

## **Material and Methods**

### **Animals**

Experiments were performed on C57BL/6J wild-type and knock-out mice for the GDF15 (GDF15-KO). The GDF15-KO mice were first provided by Dr. Se-Jin Lee (John Hopkins University, Baltimore, MD) and backcrossed with C57BL/6J (13). The animals were kept at CEF (Centre d'Explorations Fonctionnelles of the Cordeliers Research Center, Agreement no. A75-06-12).

### **Human urine samples**

The samples used to measure urine GDF15 were described previously in (3). Briefly, The healthy volunteers were Caucasian males 18 to 35 years of age. Inclusion criteria were BMI ranging from 18 to 30 kg/m<sup>2</sup>, plasma ionogram and liver panel within normal range, estimated glomerular filtration rate (MDRD) > 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. They were depleted in K<sup>+</sup> by treatment with 30 g daily sodium polystyrene sulfonates (Kayexalate®, Sanofi-Adventis France) over two days, followed by 5 days under a low-potassium diet (25 mmol/d).

### **Metabolic analysis**

To record physiological parameters, mice were placed in metabolic cages (Techniplast, France) and were fed a standard laboratory diet (0.3 % Na<sup>+</sup> and 0.6 % K<sup>+</sup>; UPAE, INRA, Jouy-en-Jossas, France) or a low-K<sup>+</sup> diet (0.28% Na<sup>+</sup> and 0.01 % K<sup>+</sup>; UPAE, INRA, Jouy-en-Jossas, France). Mubritinib (Euromedex, Souffelweyersheim, France) treatment was performed by gavage twice daily (8 mg/kg/day) for 4 days along with a normal or a low-K<sup>+</sup> diet.

Urinary creatinine concentrations and plasma ASAT were determined using an automatic analyzer (Konelab 20i; Thermo, Cergy Pontoise, France). Urinary K<sup>+</sup> concentration was determined by flame photometry (M420, Sherwood Scientific, France). Plasma K<sup>+</sup> was measured by retro-orbital puncture on the anesthetized animal (a mix of xylazine, 10mg/kg and ketamine 100mg/kg) with an Epoc pH/blood-gas analyzer (Siemens Healthineers, Saint Denis, France). Plasma and urine GDF15 were measured by ELISA test (MG150 and DGD150, for rodent and human GDF15, respectively, R&D Systems) and tissue GDF15 was measured using an ELISA test (Elabscience).

### **Quantitative PCR**

After collection, mRNA of kidney, muscle and part of the gut were extracted by the TRI reagent (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) following the manufacturer's instructions. Isolation of 40-60 renal segments was performed according to localization in the kidney (cortex vs medulla) and well-defined morphologic characteristics under binocular loupes after kidney



treatment with Liberase (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) as described in (25). RNA extraction from these segments was performed using RNeasy micro kit (Qiagen, Hilden, Germany). mRNA was then retro-transcribed into cDNA (Roche Diagnostics, France) according to the manufacturer's instructions and real-time PCRs were performed on a LightCycler (Roche Diagnostics, France). No signal was detected in samples that did not undergo reverse transcription or in blank runs without cDNA. In each run, a standard curve was obtained using serial dilution of stock cDNA.

#### **Immunolabelling on isolated OMCD for cell counting**

15-20 short OMCD segments were isolated from Liberase-treated kidney and transferred onto a Superfrost Plus glass slides and treated as described recently in (25). AIC were identified as AE1+ cells after labeling with an anti-AE1 antibody (1/500, gift from C.A. Wagner). For cell and doublet counting, a 3D reconstruction from all stacks (ImageJ) was performed from images of AE1-labelled OMCDs acquired by confocal microscopy (25).

#### **Immunolabelling for laminin on muscles**

Quadriceps were collected and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) solution for 1 hour, rinsed in PBS for 30 min and immediately frozen in optimum cutting temperature medium (OCT). Four  $\mu\text{m}$  thick sections were cut with a cryostat (Leica CM305S). Before labeling with a rabbit anti-laminine (1/400 Abcam, ab11575) and a secondary anti-rabbit antibody (Alexa Fluor 555, Abcam), the slices underwent a retrieval procedure (Tris-EDTA pH9, 10 min, 95°C). The labeled slices were then observed using an Axio Scan Z1 (Zeiss) microscope allowing acquisition of the whole slice. The muscle fiber areas were determined using the QuPath software (54) and the frequencies of distribution were assessed using GraphPad Prism software.

#### **NMR imaging of mouse hindlimbs**

NMR experiments were performed on WT and GDF15-KO mice (n=6) at baseline and 4 days after Low-K<sup>+</sup> diet. NMR data were acquired using a 7T Bruker BioSpec system interfaced with an Advance III spectrometer (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany). Mice were scanned under isoflurane anaesthesia (1-2%, 1l/min O<sub>2</sub>) on a water-heating pad. Respiratory frequency was maintained between 80-100 motions/min. The NMR setup used was a <sup>1</sup>H transceiver surface Cryoprobe placed next to the anterior compartment of the two hindlimbs. Muscle atrophy was evaluated from the maximum cross-sectional area of the legs (CSA<sub>max</sub>) measured on one slice from an axial high-resolution (50\*50\*200  $\mu\text{m}^3$ ) gradient-echo images (12 slices, slice gap = 0.5 mm, TE = 3.66 ms, TR = 166.26 ms, FA = 25°, NA = 12, acquisition time = 8 min 18s). Contours of the legs were drawn using ITK-SNAP 3.8.0 (Free Software Foundation, Inc) software.

### **Data and statistical analysis**

Results are expressed as mean±SEM. The numbers of mice used in these experiments are indicated in the legends (n). Normality of the result distribution is tested using the Shapiro-Wilk analysis. Non-parametric (One-way or two-way ANOVA tests) or parametric (Student t-test) tests were used to determine statistical significance (see the legends), differences with  $p < 0.05$  were considered significant.

### **Study approvals**

All animal experimentations were conducted in accordance with the institutional guidelines and the recommendations for the care and use of laboratory animals put forward by the Directive 2010/63/EU revising Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for scientific purposes (project has been approved by a user establishment's ethics committee and the Project Authorization: number 21927).

Regarding the use of human samples, the study was approved by the local Ethics Committee (P120906 - CPP Ile de France VI, NCT02297048) and informed consent were obtained from the volunteers before participating in the study (registered on clinical trial registry, NCT02297048).

### **Author contributions**

SL, CW, CR, LM, BM, LC: conducting experiments, acquiring data, analyzing data

AD, NP, AB, YF, GC, LC: designing research studies, analyzing data

SL, LC, GC: writing the manuscript.

### **Acknowledgements**

Physiological studies have been performed with the help of Gaëlle Brideau and Nadia Frachon from the “plateforme d'exploration fonctionnelle du petit animal” of the team “Physiologie Rénale and Tubulopathies” at the Centre de Recherche des Cordeliers. We are grateful for the technical assistance of the Centre d'Exploration Fonctionnelle crews in the management of our colony of mice. This study was supported by the Agence National de la Recherche (ANR) project ANR-21-CE14-0040-01. S.L. is supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

## References

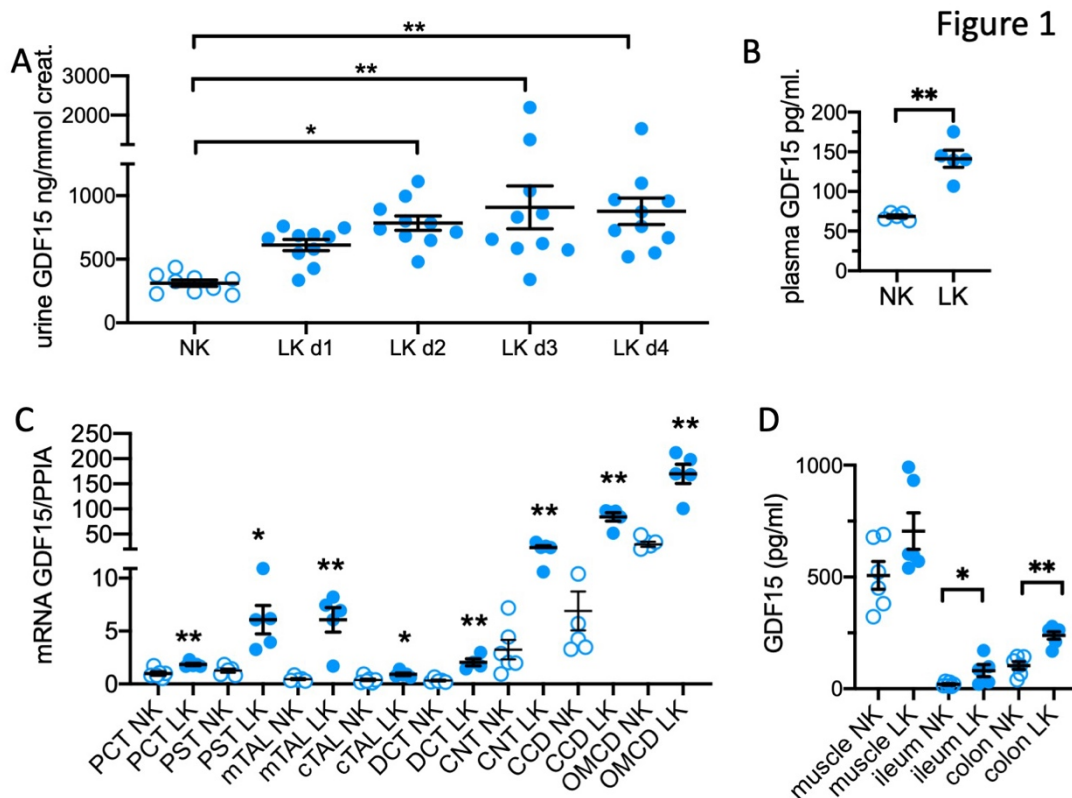
1. A. Sebastian, L. A. Frassetto, D. E. Sellmeyer, R. L. Merriam, R. C. Morris, Jr., Estimation of the net acid load of the diet of ancestral preagricultural Homo sapiens and their hominid ancestors. *Am J Clin Nutr* **76**, 1308-1316 (2002).
2. P. Meneton, J. Loffing, D. G. Warnock, Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F593-601 (2004).
3. A. Blanchard *et al.*, Adrenal adaptation in potassium-depleted men: role of progesterone? *Nephrol Dial Transplant* **35**, 1901-1908 (2020).
4. A. Mente *et al.*, Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure. *N Engl J Med* **371**, 601-611 (2014).
5. M. O'Donnell *et al.*, Urinary sodium and potassium excretion, mortality, and cardiovascular events. *N Engl J Med* **371**, 612-623 (2014).
6. A. A. McDonough, C. B. Thompson, J. H. Youn, Skeletal muscle regulates extracellular potassium. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F967-974 (2002).
7. C. S. Choi, C. B. Thompson, P. K. Leong, A. A. McDonough, J. H. Youn, Short-term K(+) deprivation provokes insulin resistance of cellular K(+) uptake revealed with the K(+) clamp. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F95-F102 (2001).
8. W. Wang, Regulation of renal K transport by dietary K intake. *Annu Rev Physiol* **66**, 547-569 (2004).
9. B. Elabida *et al.*, Chronic potassium depletion increases adrenal progesterone production that is necessary for efficient renal retention of potassium. *Kidney Int* **80**, 256-262 (2011).
10. L. Cheval *et al.*, Plasticity of mouse renal collecting duct in response to potassium depletion. *Physiol Genomics* **19**, 61-73 (2004).
11. G. P. Hansen, C. C. Tisher, R. R. Robinson, Response of the collecting duct to disturbances of acid-base and potassium balance. *Kidney Int* **17**, 326-337 (1980).
12. L. Cheval, L. Morla, J. M. Elalouf, A. Doucet, Kidney collecting duct acid-base "regulon". *Physiol Genomics* **27**, 271-281 (2006).
13. J. P. Duong Van Huyen *et al.*, GDF15 triggers homeostatic proliferation of acid-secreting collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* **19**, 1965-1974 (2008).
14. A. Assadi, A. Zahabi, R. A. Hart, GDF15, an update of the physiological and pathological roles it plays: a review. *Pflugers Arch* **472**, 1535-1546 (2020).

15. L. Mulderrig *et al.*, Aldehyde-driven transcriptional stress triggers an anorexic DNA damage response. *Nature* **600**, 158-163 (2021).
16. I. Cimino *et al.*, Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by exogenous and endogenous GDF15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118** (2021).
17. N. S. Poulsen *et al.*, Growth and differentiation factor 15 as a biomarker for mitochondrial myopathy. *Mitochondrion* **50**, 35-41 (2020).
18. Y. Fujita *et al.*, GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* **20**, 34-42 (2015).
19. Y. Fujita, Y. Taniguchi, S. Shinkai, M. Tanaka, M. Ito, Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders. *Geriatr Gerontol Int* **16 Suppl 1**, 17-29 (2016).
20. Y. Xiong *et al.*, Long-acting MIC-1/GDF15 molecules to treat obesity: Evidence from mice to monkeys. *Sci Transl Med* **9** (2017).
21. V. W. Tsai *et al.*, Treatment with the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1/GDF15 reduces the adiposity and corrects the metabolic dysfunction of mice with diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* **42**, 561-571 (2018).
22. M. Ost *et al.*, Muscle-derived GDF15 drives diurnal anorexia and systemic metabolic remodeling during mitochondrial stress. *EMBO Rep* **21**, e48804 (2020).
23. V. W. Tsai *et al.*, TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1/GDF15 is a physiological appetite and body weight regulator. *PLoS One* **8**, e55174 (2013).
24. T. Tanaka *et al.*, Plasma proteomic signature of age in healthy humans. *Aging Cell* **17**, e12799 (2018).
25. L. Cheval *et al.*, Acidosis-induced activation of distal nephron principal cells triggers Gdf15 secretion and adaptive proliferation of intercalated cells. *Acta Physiol (Oxf)* **232**, e13661 (2021).
26. S. N. Breit, D. A. Brown, V. W. Tsai, The GDF15-GFRAL Pathway in Health and Metabolic Disease: Friend or Foe? *Annu Rev Physiol* **83**, 127-151 (2021).
27. S. C. Bodine *et al.*, Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708 (2001).
28. S. G. Kalko *et al.*, Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies. *BMC Genomics* **15**, 91 (2014).

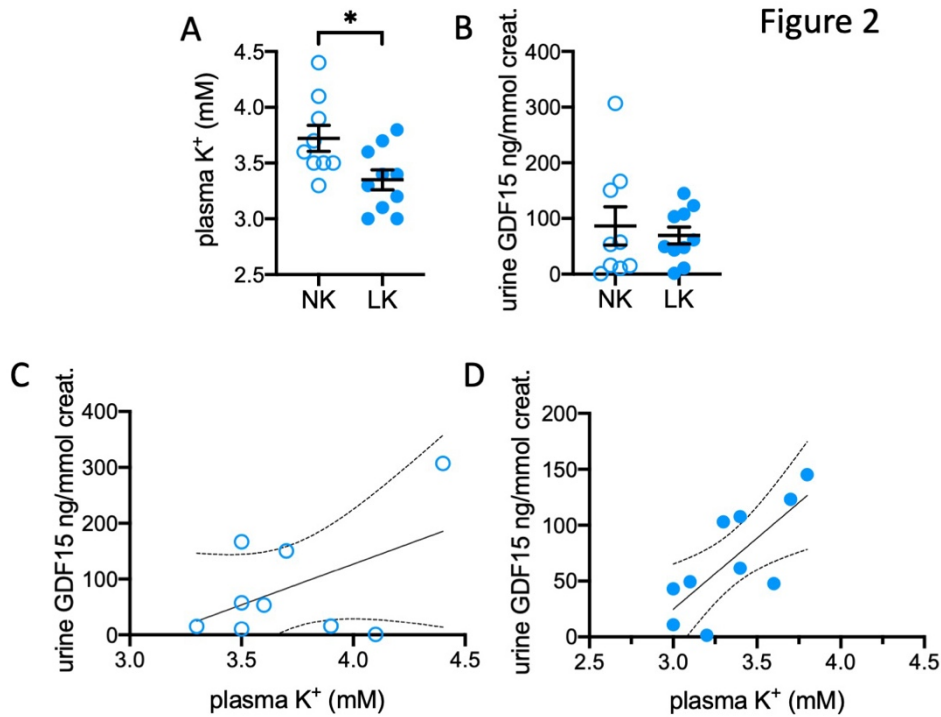
29. R. Montero *et al.*, GDF-15 Is Elevated in Children with Mitochondrial Diseases and Is Induced by Mitochondrial Dysfunction. *PLoS One* **11**, e0148709 (2016).
30. S. Yatsuga *et al.*, Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann Neurol* **78**, 814-823 (2015).
31. K. Chrysovergis *et al.*, NAG-1/GDF-15 prevents obesity by increasing thermogenesis, lipolysis and oxidative metabolism. *Int J Obes (Lond)* **38**, 1555-1564 (2014).
32. T. Tran, J. Yang, J. Gardner, Y. Xiong, GDF15 deficiency promotes high fat diet-induced obesity in mice. *PLoS One* **13**, e0201584 (2018).
33. J. E. Jones *et al.*, Supraphysiologic Administration of GDF11 Induces Cachexia in Part by Upregulating GDF15. *Cell Rep* **22**, 3375 (2018).
34. C. Hale, M. M. Veniant, Growth differentiation factor 15 as a potential therapeutic for treating obesity. *Mol Metab* **46**, 101117 (2021).
35. J. Wischhusen, I. Melero, W. H. Fridman, Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Front Immunol* **11**, 951 (2020).
36. F. Solagna *et al.*, Pro-cachectic factors link experimental and human chronic kidney disease to skeletal muscle wasting programs. *J Clin Invest* **131** (2021).
37. Y. I. Kim, H. W. Shin, Y. S. Chun, J. W. Park, CST3 and GDF15 ameliorate renal fibrosis by inhibiting fibroblast growth and activation. *Biochem Biophys Res Commun* **500**, 288-295 (2018).
38. T. Kimura *et al.*, Expression of Bcl-2 and Bax in hypokalemic nephropathy in rats. *Pathobiology* **69**, 237-248 (2001).
39. E. Y. Park *et al.*, Proposed mechanism in the change of cellular composition in the outer medullary collecting duct during potassium homeostasis. *Histol Histopathol* **27**, 1559-1577 (2012).
40. X. Gao *et al.*, Deletion of hensen/DMBT1 blocks conversion of  $\beta$ - to  $\alpha$ -intercalated cells and induces distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1010364107 [pii] 10.1073/pnas.1010364107 (2010).
41. A. Iervolino *et al.*, Potassium depletion induces cellular conversion in the outer medullary collecting duct altering Notch signaling pathway. *Sci Rep* **10**, 5708 (2020).
42. S. E. Mullican *et al.*, GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nat Med* **23**, 1150-1157 (2017).

43. C. Lv, S. Li, J. Zhao, P. Yang, C. Yang, M1 Macrophages Enhance Survival and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma by Inducing GDF15-Mediated ErbB2 Phosphorylation. *ACS Omega* **7**, 11405-11414 (2022).
44. J. P. Joshi, N. E. Brown, S. E. Griner, R. Nahta, Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* **82**, 1090-1099 (2011).
45. T. C. Zhao *et al.*, Mechanism of sensitivity to cisplatin, docetaxel, and 5-fluorouracil chemoagents and potential erbB2 alternatives in oral cancer with growth differentiation factor 15 overexpression. *Cancer Sci* **113**, 478-488 (2022).
46. S. Li, Y. M. Ma, P. S. Zheng, P. Zhang, GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2. *J Exp Clin Cancer Res* **37**, 80 (2018).
47. E. A. Day *et al.*, Metformin-induced increases in GDF15 are important for suppressing appetite and promoting weight loss. *Nat Metab* **1**, 1202-1208 (2019).
48. A. P. Coll *et al.*, GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance. *Nature* **578**, 444-448 (2020).
49. C. Laurens *et al.*, Growth and differentiation factor 15 is secreted by skeletal muscle during exercise and promotes lipolysis in humans. *JCI Insight* **5** (2020).
50. J. H. Youn, Gut sensing of potassium intake and its role in potassium homeostasis. *Semin Nephrol* **33**, 248-256 (2013).
51. C. S. Choi, F. N. Lee, A. A. McDonough, J. H. Youn, Independent regulation of in vivo insulin action on glucose versus K(+) uptake by dietary fat and K(+) content. *Diabetes* **51**, 915-920 (2002).
52. C. B. Thompson, A. A. McDonough, Skeletal muscle Na,K-ATPase alpha and beta subunit protein levels respond to hypokalemic challenge with isoform and muscle type specificity. *J Biol Chem* **271**, 32653-32658 (1996).
53. S. P. Yu, Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol* **70**, 363-386 (2003).
54. P. Bankhead *et al.*, QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* **7**, 16878 (2017).

## Figures



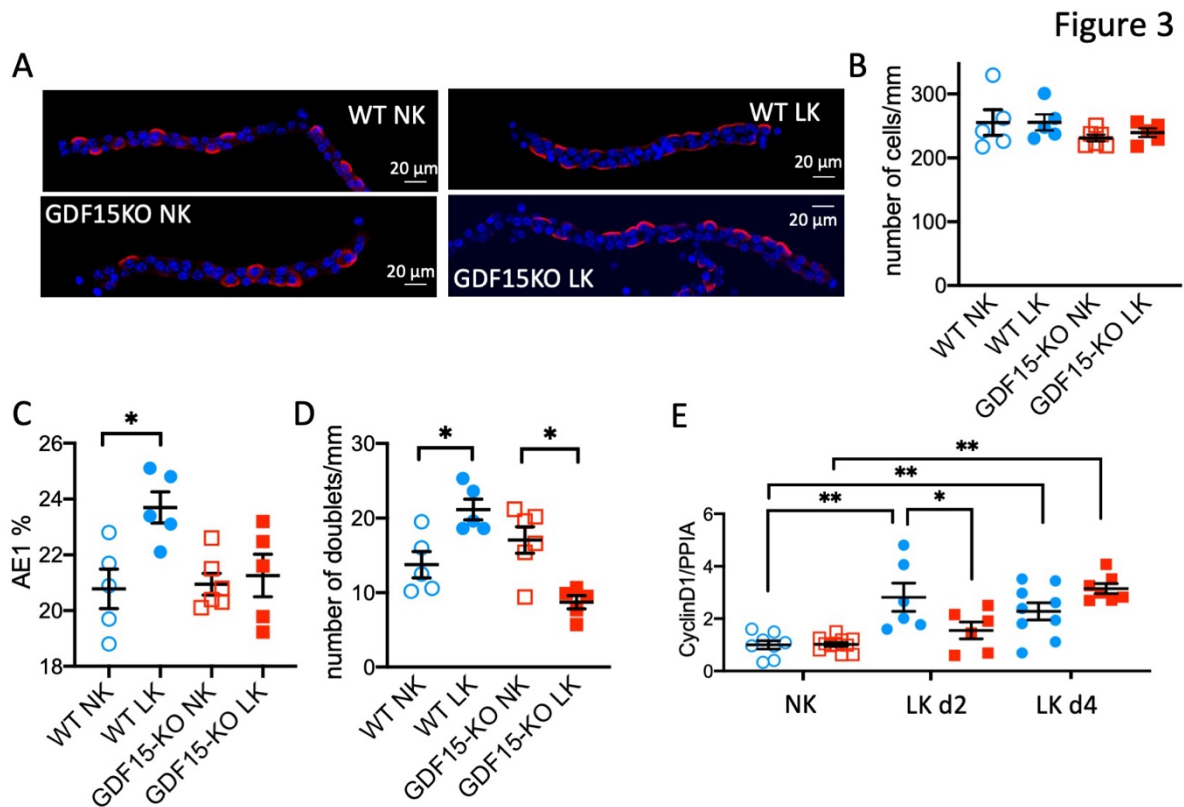
**Figure 1: GDF15 is produced in response to  $K^+$  restriction.** **A/** Urine GDF15 normalized by urine creatinine under control condition (NK, empty symbols) and at day 1 to 4 of a low- $K^+$  diet period (LK, filled symbols). Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=10) and analyzed by a one-way ANOVA test (p<0.01) followed by a Dunett's multiple comparison test with NK group as a control group (\*\* p<0.01; \* p<0.05). **B/** Plasma GDF15 level in mice under normal diet (NK, empty symbols) or  $K^+$ -restriction for 4 days (LK, filled symbols). Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=4-5) and analyzed by an unpaired Student t test (\*\* p<0.01). **C/** mRNA expression of GDF15 in isolated proximal convoluted tubules (PCT), proximal straight tubules (PST), medullary and cortical thick ascending limb (m and cTAL), distal convoluted tubule (DCT), connecting tubule (CNT) and cortical or outer medullary collecting duct (CCD and OMCD) of mice under normal diet (NK, empty symbols) or  $K^+$ -restriction for 4 days (LK, filled symbols). Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=5) and analyzed by comparing the effect of the diet on each segment independently of the others by a Mann-Whitney test (\*\* p<0.01; \* p<0.05). **D/** GDF15 protein expression was measured in muscle (gastrotonecnius), ileum and distal colon tissues by ELISA in mice under normal diet (NK, empty symbols) or  $K^+$ -restriction for 4 days (LK, filled symbols). Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=6) and analyzed by a Mann-Whitney test (\*\* p<0.01).



**Figure 2: Urine GDF15 level correlates with plasma K<sup>+</sup> value in human under dietary K<sup>+</sup> restriction.**

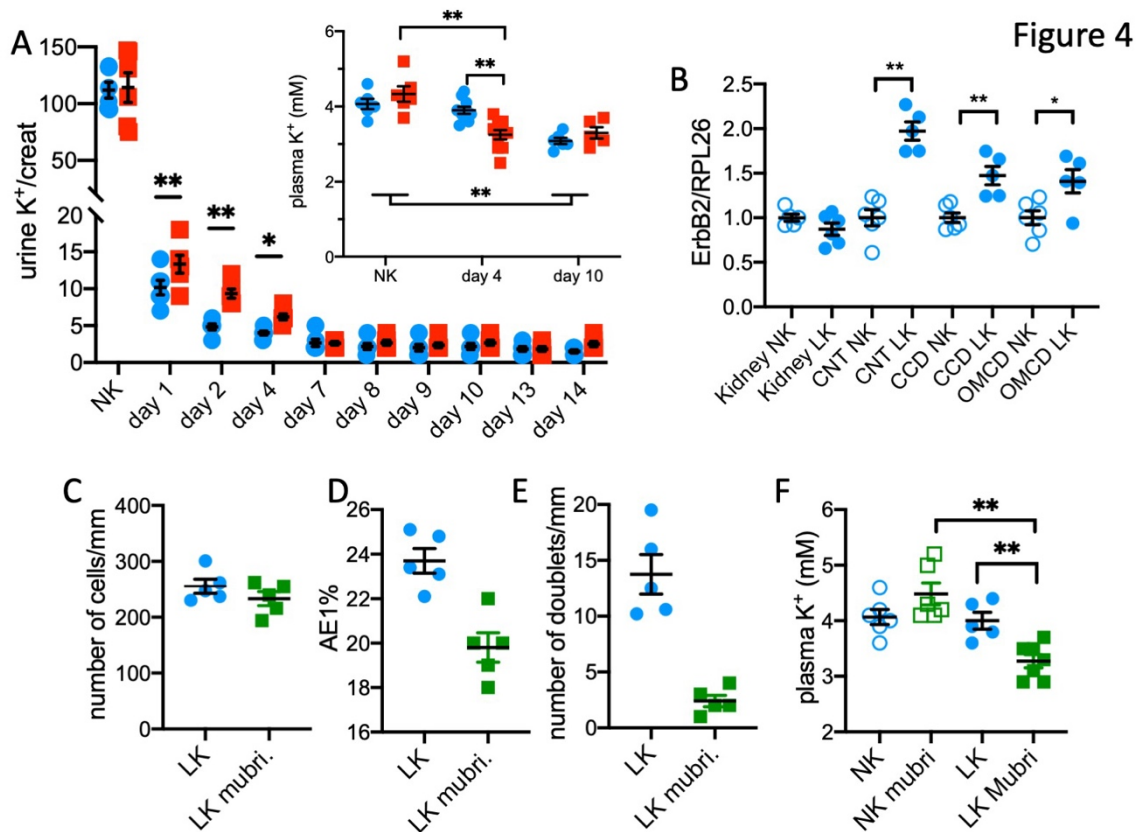
The groups of healthy volunteers under normal diet (NK, empty symbols) or K<sup>+</sup>-restriction (LK, filled symbols) were already characterized in (3). **A/** plasma K<sup>+</sup> values in NK (n=9) or LK (n=10). Results are shown as mean±SEM and analyzed by a Wilcoxon test (\* p<0.05). **B/** urine GDF15 excretion measured by ELISA. Results are shown as mean±SEM and analyzed by a Wilcoxon test (\* p<0.05). Correlation between both parameters for NK group (**C**) and LK group (**D**) assessed with a simple linear regression test indicating that the slope is not different from 0 in the NK group with a Pearson R squared of 0.497 whereas it is in LK group (p=0.013) with a Pearson R squared of 0.749.





**Figure 3: GDF15 is involved in proliferation of ICA under low-K<sup>+</sup> diet**

**A/** Examples of immunofluorescence pictures obtained by confocal microscopy from isolated OMCD from WT (circles) or GDF15-KO (squares) mice under normal (empty symbols) or K<sup>+</sup>-restriction for 4 days (filled symbols) labelled with DAPI (blue) and anti-AE1 antibody (red). The stacks of these images were then used to reconstruct tubules in 3D in order to accurately count the number of nucleus (**B**), the number of AE1+ cells (**C**) and the number of AE1+ doublet (at least two AE1 + cells with cell-cell contact, (**D**)). Each symbol represents the mean value of 7-11 reconstructed tubules of the same animal. Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=5-6) and analyzed by a Mann-Whitney test (\*\* p<0.01). **E/** Cyclin D1 mRNA expression in WT (circles) or GDF15-KO mice (squares) under normal (empty symbols) or K<sup>+</sup>-restriction (filled symbols) for 2 and 4 days (n=6-10). Results are shown as mean $\pm$ SEM and analyzed by a two-way ANOVA followed by a Sidak's multiple comparison test. Cyclin D1 expression is strongly affected by the period of the K<sup>+</sup>-restriction (p<0.01) and by the combination of both treatment period and genotype (p<0.01) but not by the genotype itself (p=0.25).



**Figure 4: GDF15 regulates  $K^+$  balance under low- $K^+$  diet**

**A/** Urine  $K^+$  excretion normalized by urine creatinine under control condition (NK) and at day 1 to 14 of a low- $K^+$  diet (LK) in WT (circles) or GDF15-KO (squares) mice. Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=6) and analyzed by a two-way ANOVA followed by a Sidak's multiple comparison test (\*\* p<0.01, \* p<0.05). **Inset** Plasma  $K^+$  level under control condition (NK) and at day 4 and 10 of a low- $K^+$  diet (LK) in WT (circles) or GDF15-KO (squares) mice. Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=6-8) and analyzed by a two-way ANOVA followed by a Sidak's multiple comparison test (\*\* p<0.01, \* p<0.05). **B/** mRNA expression of ErbB2 in total kidney or CNT, CCD and OMCD renal segments of mice under normal diet (NK, empty symbols) or  $K^+$ -restriction for 4 days (LK, filled symbols). Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=5-6) and analyzed by comparing the effect of the diet on each segment independently of the others by a Mann-Whitney test (\*\* p<0.01; \* p<0.05). Number of nucleus (**C**), number of AE1+ cells (**D**) and the number of AE1+ doublets (**E**) in WT mice under low- $K^+$  diet for 4 days (LK) in the absence (filled circles) or the presence (filled squares) of mubritinib treatment. Each symbol represents the mean value of 7-11 reconstructed tubules of the same animal. Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=4-5) and analyzed by a Mann-Whitney test (\*\* p<0.01). **F/** Plasma  $K^+$  level in WT mice under control condition (NK, empty symbols) and at day 4 of a low- $K^+$  diet (LK, filled symbols) in the absence (circles) or presence (squares) of mubritinib treatment. Results are shown as mean $\pm$ SEM (n=5-7) and analyzed by a two-way ANOVA followed by a Sidak's multiple comparison test (\*\* p<0.01, \* p<0.05).

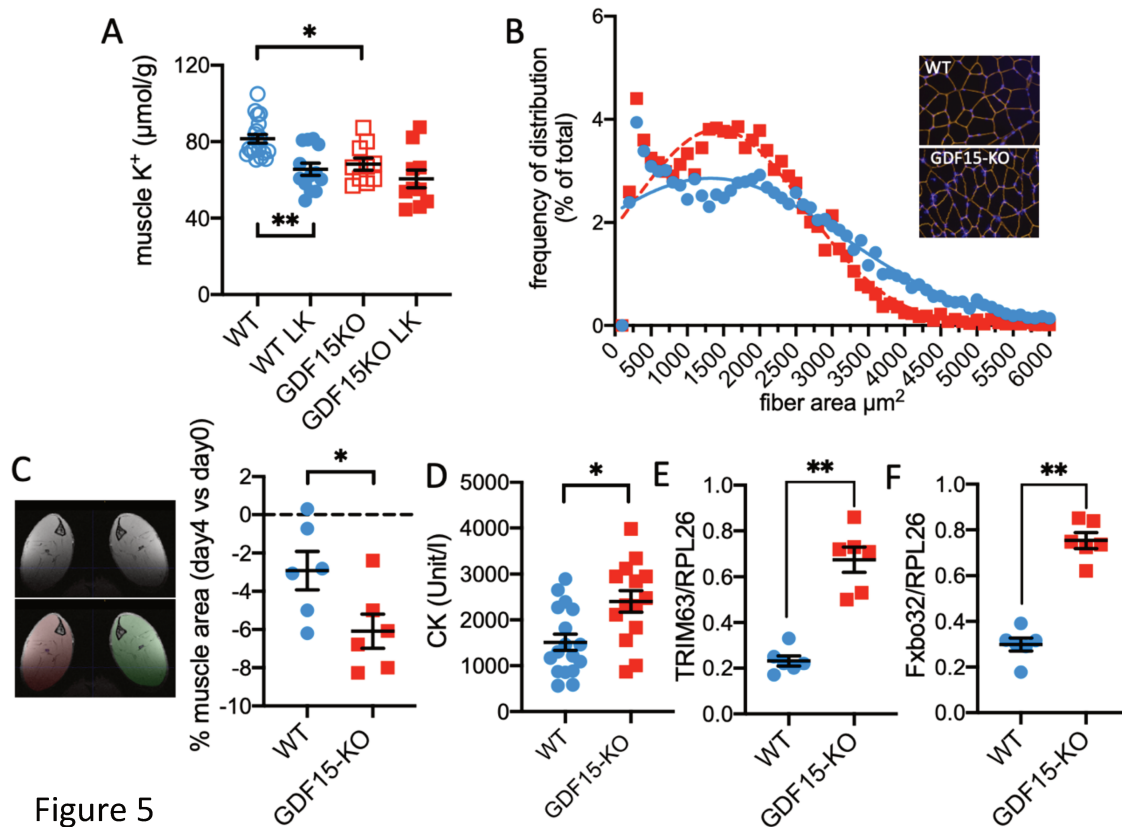


Figure 5

**Figure 5: Muscle differentially contributes to K<sup>+</sup> balance in WT and GDF15-KO mice**

**A/** Muscle K<sup>+</sup> content from gastronemius of WT (circles) and GDF15-KO (squares) mice under normal diet (empty symbols) and LK diet (day 4, filled symbols). Results are shown as mean±SEM (n=5) and analyzed by one way ANOVA test (\* p<0.05). **B/** Distribution of the frequency of muscle fiber area in quadriceps of WT (blue circles, plain line) and GDF15-KO (red squares, dotted line) mice under LK diet for 4 days (bin width 100 μm<sup>2</sup>, n=3 mice, 2 slices/mouse, 8197 and 8734 fibers analyzed in WT and GDF15-KO mice, respectively). Gaussian curves were fitted to the data of WT and GDF15-KO mice, respectively. **C/** Example of the NMR images of the hindlimb muscles from a WT mouse under low-K diet. Colored portions correspond to the region of interest (ROI) used for calculation of the muscle area. Measurements were performed in WT (circles) and GDF15-KO (squares) mice in normal K<sup>+</sup> diet and after 4 days of low-K<sup>+</sup> diets. For the same animals, the differences of the muscle surfaces, between the day before diet modification and the day 4 of the LK diet, were calculated. Results are shown as mean±SEM (n=6) and analyzed by a non-paired Student t-test (\*p<0.05). **D/** Plasma creatine kinase (CK) activity of WT (circles) and GDF15-KO (squares) mice under LK diet (day 4). Results are shown as mean±SEM (n=14) and analyzed by non-paired Student t-test (\* p<0.05). **E** and **F/** mRNA expression of TRIM63 and Fxbo32 in muscles from WT (circles) and GDF15-KO (squares) mice under LK diet (day 4). Results are shown as mean±SEM (n=6) and analyzed by non-paired Student t-test (\*\* p<0.01).

Genotype	Day-1 NK		Day 4 LK		Day 14 LK	
	WT	GDF15-KO	WT	GDF15-KO	WT	GDF15-KO
Weight (g)	23±1.3	26±1	22±1.4	26±1	20±1.2	26±1**
Food intake (g)	4.2±0.2	3.8±0.3	2.7±0.2	3.3±0.3	2.7±0.2	3.1±0.2
Urine vol. (ml)	1.2±0.2	1.7±0.7	2.4±0.4	3.6±0.6	4.2±0.6	5.7±0.3

Table 1: Physiological parameters of WT or GDF15-KO, under normal (NK) or low-K<sup>+</sup> diet (LK). Results are shown as mean±s.e.m. Two-way ANOVA test followed by a Sidak's multiple comparisons test, (WT vs GDF15-KO \* p<0.05; \*\* p<0.01)

## **DEUXIEME ETUDE : HOMEOSTASIE DU POTASSIUM AU COURS DE LA GESTATION**

## I. Introduction

La gestation est un état physiologique qui nécessite des modifications à la fois physiologiques et anatomiques du système cardiovasculaire et rénal afin de permettre à la femme enceinte de faire face aux besoins du développement du fœtus. Le métabolisme électrolytique, qui dépend en grande partie de la fonction rénale, est modifié afin de pouvoir apporter tous les nutriments nécessaires à l'embryon. Le développement de l'embryon nécessite notamment une grande quantité de  $K^+$ . À la fin de la gestation, la femme a accumulée 300 mmol de  $K^+$  en plus, ce qui représente 10 à 15% du contenu total en  $K^+$  de l'organisme (Lindheimer *et al.*, 1987). L'adaptation rénale au cours de la gestation est essentielle, et l'altération de cette dernière peut être délétère. Il a été démontré que l'insuffisance rénale chronique augmentait le risque de complications de la grossesse avec, par exemple, le développement d'une prééclampsie ou un accouchement prématuré (Jones, 1996). Par ailleurs, le risque de prééclampsie était inversement proportionnel aux apports journaliers de  $K^+$  (Frederick *et al.*, 2005). Il a été démontré dans notre laboratoire, et confirmé par d'autres, que la HKA2 était stimulée par la progestérone au cours de la gestation et permettait la rétention de  $K^+$  (Elabida *et al.*, 2011; Salhi *et al.*, 2013; West *et al.*, 2018). L'absence de la HKA2 impacte la gestation des souris HKA2<sup>-/-</sup> en empêchant la rétention efficace de  $K^+$  (Salhi *et al.*, 2013). En effet, les souris HKA2<sup>-/-</sup> présentent une baisse du taux de fertilité, des portées plus petites, et un taux de mortalité des fœtus plus important comparées aux souris WT. Ce phénotype a pu être corrigé par la supplémentation en  $K^+$  des souris HKA2<sup>-/-</sup> (Salhi *et al.*, 2013). Nous avons cependant observé que bien que les souris HKA2<sup>-/-</sup> ne retenaient pas le  $K^+$  efficacement, elles réussissaient à maintenir une kaliémie dans des valeurs physiologiques et ne développaient donc pas d'hypokaliémie. Nous avons donc émis et testé l'hypothèse selon laquelle les souris HKA2<sup>-/-</sup> limiteraient leur expansion du volume extracellulaire au cours de la gestation afin d'empêcher l'apparition d'une hypokaliémie. Nous avons déjà observé ce phénomène chez des souris HKA2<sup>-/-</sup> en restriction potassique qui étaient capables de limiter la sévérité de l'hypokaliémie par une baisse de leur volume extracellulaire d'environ 20% (Walter *et al.*, 2016). Nous avons donc étudié la régulation des systèmes de transport de  $Na^+$  connus pour être impliqués dans l'expansion du volume plasmatique pendant la gestation chez des souris WT et HKA2<sup>-/-</sup> gestantes. Nous nous sommes concentrés sur le système de transport de  $Na^+$  au niveau des cellules du tubule contourné distal *via* NCC, au niveau des cellules principales *via* ENaC, au niveau des cellules intercalaires de type B *via* le couple pendrine et l'échangeur de  $Na^+ Cl^- / HCO_3^-$  NDCBE, et le transport de l'eau par l'aquaporine 2. Nous avons démontré que les souris

HKA2<sup>-/-</sup> gestantes limitent l'augmentation de leur volume extracellulaire comparées aux souris WT gestantes. Chez ces dernières, l'expression du canal ENaC et de l'échangeur pendrine est stimulée alors que l'expression du co-transporteur NCC est diminuée. Ces modifications des systèmes de transports de Na<sup>+</sup> sont atténuées chez les souris HKA2<sup>-/-</sup> gestantes. L'altération de l'adaptation rénale chez les souris HKA2<sup>-/-</sup> gravides, s'accompagne du développement d'une hypotension. Ces résultats démontrent que la HKA2 est un acteur clé du contrôle rénal du métabolisme sodé et potassique pendant la gestation et que le maintien de la kaliémie peut se faire au détriment du volume extracellulaire et de la pression artérielle.

## II. Article du projet

*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 318: R320–R328, 2020.  
First published January 8, 2020; doi:10.1152/ajpregu.00067.2019.

### RESEARCH ARTICLE | *Fluid and Electrolyte Homeostasis*

## H,K-ATPase type 2 regulates gestational extracellular compartment expansion and blood pressure in mice

Christine Walter,<sup>1,2\*</sup> Chloé Rafael,<sup>1,2\*</sup> Samia Lasaad,<sup>1,2</sup> Stéphanie Baron,<sup>1,2,3</sup> Amel Salhi,<sup>1,2</sup> and Gilles Crambert<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche des Cordeliers, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Sorbonne Université, Sorbonne Paris Cité Université, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France; <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, ERL 8228, Laboratoire de Physiologie Rénale et Tubulopathies, Paris, France; and <sup>3</sup>Hôpital Européen Georges Pompidou, Laboratoire de Physiologie, Paris, France

Submitted 6 March 2019; accepted in final form 10 December 2019

**Walter C, Rafael C, Lasaad S, Baron S, Salhi A, Crambert G.** H,K-ATPase type 2 regulates gestational extracellular compartment expansion and blood pressure in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 318: R320–R328, 2020. First published January 8, 2020; doi:10.1152/ajpregu.00067.2019.—The modifications of the hemodynamic system and hydromineral metabolism are physiological features characterizing a normal gestation. Thus, the ability to expand plasma volume without increasing the level of blood pressure is necessary for the correct perfusion of the placenta. The kidney is essential in this adaptation by reabsorbing avidly sodium and fluid. In this study, we observed that the H,K-ATPase type 2 (HKA2), an ion pump expressed in kidney and colon and already involved in the control of the K<sup>+</sup> balance during gestation, is also required for the correct plasma volume expansion and to maintain normal blood pressure. Indeed, compared with WT pregnant mice that exhibit a 1.6-fold increase of their plasma volume, pregnant HKA2-null mice (HKA2KO) only modestly expand their extracellular volume ( $\times 1.2$ ). The renal expression of the epithelial Na channel (ENaC)  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subunits and that of the pendrin are stimulated in gravid WT mice, whereas the Na/Cl<sup>-</sup> cotransporter (NCC) expression is downregulated. These modifications are all blunted in HKA2KO mice. This impeded renal adaptation to gestation is accompanied by the development of hypotension in the pregnant HKA2KO mice. Altogether, our results showed that the absence of the HKA2 during gestation leads to an “underfilled” situation and has established this transporter as a key player of the renal control of salt and potassium metabolism during gestation.

ATP12A; blood pressure; kidney; Na<sup>+</sup> retention; pregnancy

### INTRODUCTION

Gestation is a physiological situation requiring strong adaptation of the cardiorenal systems in order to cope with the demands of the growing fetus. For this purpose, the extracellular volume is increased by 30–50%, which is accompanied by a decrease in plasma osmolality and plasma Na<sup>+</sup> levels (13). Interestingly, under a normal (nongestational) situation, the decrease of these two parameters should trigger the inhibition of vasopressin (AVP) production and renal water reab-

sorption to secrete fluid. However, during gestation, the sensitivity of osmoreceptors is modified, and AVP production is maintained for reduced levels of plasma osmolality (13). In addition to salt and water, K<sup>+</sup> is also retained during gestation, in part, through the stimulation of the H,K-ATPase type 2 (HKA2) (30, 41). This electroneutral transporter (4) consists of two subunits, a catalytic  $\alpha$ -subunit (encoded by the *Atp12a* gene) that may combine, in heterologous systems, with different chaperone-like  $\beta$ -subunits (10, 16). This transporter exhibits pharmacological and transport features common to two closely related P-type ATPases, the Na,K-ATPase and the H,K-ATPase type 1 (for review, see Ref. 9). For instance, HKA2 may transport Na<sup>+</sup> instead of H<sup>+</sup> (5, 7, 10) and is sensitive to ouabain (1, 8, 33) like the Na,K-ATPase and contributes to the renal secretion of salt (14, 26). It also transports H<sup>+</sup> and is sensitive to Schering 28080 (27) as the H,K-ATPase type 1. The expression of the HKA2 is stimulated by progesterone through a nuclear progesterone receptor-dependent pathways, which induces K<sup>+</sup> retention (15, 17), and this regulatory process may be relevant during gestation.

We have previously shown that the absence of the HKA2 impacts gestation of mice by impeding efficient K<sup>+</sup> retention (30). Indeed, during gestation, HKA2KO mice display a decrease in fertility rate, smaller litter size, and higher mortality rate. This phenotype can be reversed by a dietary supplementation in K<sup>+</sup>. Surprisingly, although those mice do not retain K<sup>+</sup> as efficiently as their WT littermates during gestation, their plasma K<sup>+</sup> level remains in the normal range (30). Therefore, we have drawn and tested the hypothesis that this normal plasma K<sup>+</sup> level may be the result of an altered extracellular volume expansion during gestation of HKA2KO mice that would compensate for a putative development of hypokalemia. We will focus on the regulation of the Na transport systems known to be involved in plasma volume expansion during gestation and study the electrogenic transport system of Na<sup>+</sup> present in the principal cells of the collecting duct mediated by the amiloride-sensitive Na channel (ENaC), the electroneutral ones present in the distal convoluted tubules cells (mediated by the Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-exchanger, NCC), and in the  $\beta$ -intercalated cells (mediated by the couple pendrin and the Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger, NDCBE) and the transport of water by the aquaporin 2 (AQP2).

\* C. Walter and C. Rafael contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: G. Crambert, Centre de Recherche des Cordeliers, Laboratoire de Physiologie Rénale et Tubulopathies, 15 rue de l'École de Médecine, 75270 Paris cedex, France (e-mail: gilles.crambert@crc.jussieu.fr).



Table 1. General parameters of WT and HKA2KO mice under basal state and during the late part of the gestation

Parameter	WT		HKA2KO	
	NP	P	NP	P
Weight, g	20.9 ± 0.5	31.9 ± 0.4	21.6 ± 0.5	31.5 ± 0.7
Number of fetuses		8.2 ± 0.2		7.5 ± 0.8

Values are expressed as means ± SE. The number of fetuses has been calculated after euthanasia of the pregnant females at *day 16* after coitus and does not necessarily correspond to the number of viable pups. HKA2KO, H,K-ATPase type 2 knockout; NP, nonpregnant; P, pregnant; WT, wild type.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Experiments were performed on C57BL/6J wild-type and knockout mice for the HKA2  $\alpha$ -subunit gene (22). All the animals were kept at CEF (Centre d'Explorations Fonctionnelles des Cordeliers Research Center, agreement no. A75-06-12). All experiments were conducted in accordance with the institutional guidelines and the recommendations for the care and use of laboratory animals put forward by the Directive 2010/63/EU revising Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for scientific purposes; the project was approved by a user establishment's ethics committee (project authorization number 2289.01). Female WT and HKA2KO were placed for a night with a WT isolated male. The observation of a vaginal plug the next morning confirmed the mating. The weight of females was then followed every day to confirm the pregnancy (P). Nonpregnant female mice (not mated with males, NP) served as control for all measured parameters.

**Physiological measurements.** To record physiological parameters, NP and pregnant (*day 16*, P) mice were placed in metabolic cages (Techniplast, France) and were fed a standard laboratory diet (0.3% Na<sup>+</sup> and 0.6% K<sup>+</sup>; Safe France for more information regarding the

detailed composition; see <http://www.safe-diets.com/wp-content/uploads/2018/01/DS-SAFE-A04.pdf>). In mice, the gestation lasts 18–20 days; therefore, we have chosen *day 16* as a representative time point of the late phase of the pregnancy. Urinary creatinine concentrations were determined using an automatic analyzer (Konelab 20i; Thermo, Cergy Pontoise, France). Urinary Na<sup>+</sup> concentration was determined by flame photometry (IL943, Instruments Laboratory, France), and plasma parameters (plasma Na<sup>+</sup> and hematocrit) were measured by retro-orbital puncture on the anesthetized animals with an ABL77 pH/blood-gas analyzer (Radiometer, Lyon, France). Thiazide (HCTZ) and amiloride-sensitive natriuresis was measured as previously described (21, 25). Briefly, the diuretics were administered intraperitoneally in conscious animals placed in metabolic cages (HCTZ: 50 mg/kg for 6 h of urine collection and amiloride: 5 mg/kg for 4 h of urine collection). Plasma volume was determined by Evans blue dye dilution, as previously described (3, 6, 24) in anesthetized animals (a mix of xylazine, 10 mg/kg and ketamine 100 mg/kg). Plasma osmolality was measured using an osmometer (Vogel, Bioblock Scientific, Strasbourg, France). Urine aldosterone concentration was determined with a chemiluminescent immunoassay (Diasorin, Salluggia, Italy) after 24 h pH 1 acid hydrolysis. Blood pressure was measured in conscious restrained mice by a tail-cuffed plethysmography method (BP2000, Visitech System, France) after a week of adaptation to the apparatus between 9:00 and 11:00 AM before mating. We have chosen the tail-cuff technique instead of the telemetry because it is less invasive and does not require anesthetization of the pregnant mice for implantation of the probe. After these measurements, nonpregnant and pregnant females were euthanized for tissue and organ removal.

**Quantitative PCR.** RNAs were extracted from whole kidneys using the TRI reagent (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) following the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was then reverse-transcribed using the first strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics, France), according to the manufacturer's

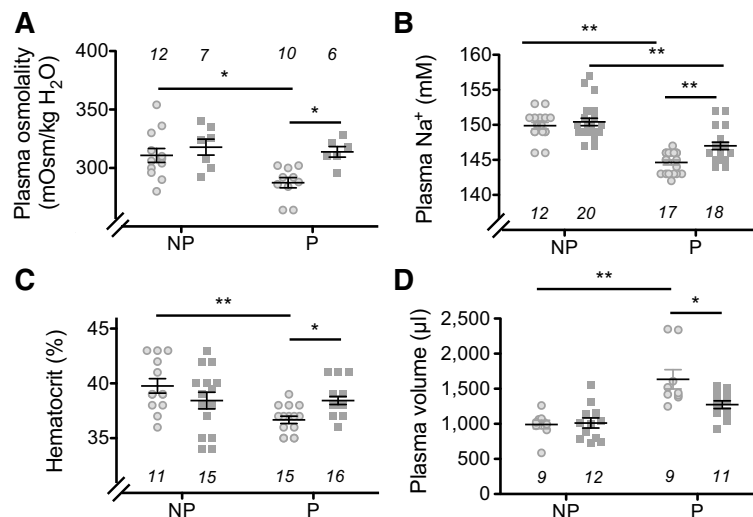


Fig. 1. Characteristics of the plasma volume expansion during gestation in wild-type (WT) and H,K-ATPase type 2 knockout (HKA2KO) mice. Plasma osmolality (A), plasma Na<sup>+</sup> level (B), and hematocrit (C) were measured on the same groups of animals following a retro-orbital puncture. D: measurement of the plasma volume by the Evans blue dye dilution technique was performed in separated groups of mice to avoid consequences of retro-orbital puncture on the results. The groups presented are nonpregnant (NP) and pregnant (P) WT (circles) and NP and P HKA2KO mice (squares). Results are shown as the means ± SE. Numbers in italic denote number of mice. Two-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple-comparisons test (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ). Plasma osmolality (A) is significantly impacted by the state of the mice (NP or P,  $P = 0.0292$ ), by the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.009$ ) but not by the interaction of both ( $P = 0.116$ ). Plasma Na<sup>+</sup> (B) is significantly impacted by the state of the mice (NP or P,  $P < 0.0001$ ), by the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.004$ ) but not by the interaction of both ( $P = 0.067$ ). Hematocrit (C) is significantly impacted by the state of the mice (NP or P,  $P = 0.007$ ), but not by the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.694$ ) and the interaction of both ( $P = 0.007$ ). Plasma volume (D) is significantly impacted by the state of the mice (NP or P,  $P < 0.0001$ ), by the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.048$ ), and by the interaction of both ( $P = 0.027$ ).

instructions. Real-time PCRs were performed on a LightCycler (Roche Diagnostics). No signal was detected in samples that did not undergo reverse transcription or in blank runs without cDNA. In each run, a standard curve was obtained using serial dilution of stock cDNA prepared from mouse kidney total RNA. The expression of the *Rps15* gene is used to normalize the results. The renal expression of this gene is not modified by pregnancy (data not shown). Specific primers are listed: for ENaC $\alpha$  (forward: CCAAACGAACCGAACAC and reverse: TGTCAGACTTACTCTAGCC); ENaC $\beta$  (forward: GGTCCTTATTGATGAGCG and reverse: AGGCGTGAAGTTC-CGA), ENaC $\gamma$  (forward TCGGTGCTGTGTGCA and reverse GCA-GATCATCGTCCGTAT); pendrin (forward: CAAAATACCGAGT-CAAGGAATGGCT and reverse: CGTTACCGCTGGGCACAAGA); NCC (forward: TCTCACCTCCTCATCCCCTATCT and reverse: CAGAGCAGCATCCGAGAGTAATC); NDBCE (forward: TTCA-ACCCATTCAAACTCTTCTATGT and reverse: CCAATGAGCT-GAAGCAAGAAA), and *rps15* (forward: TTTCCGAGTAACCGCC and reverse: GCAGTGAGTGTGCTT) transcripts were chosen using the LC Probe design 2.0 software.

**Membrane protein extraction and Western blot analysis.** Whole kidneys were homogenized in a lysis buffer [250 mM sucrose, 100 mM Tris-HEPES, pH 7.4, and protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics)]. After removal of aggregates and nuclear-associated membrane by low-speed centrifugations, the plasma membrane enriched fraction (17,000 g for 30 min) was recovered into the lysis buffer, and its protein content was measured with the BCA method (Thermo Scientific Pierce). Forty micrograms of protein were then denatured, resolved by SDS-PAGE (10% polyacrylamide), and transferred onto a nitrocellulose membrane. Ponceau red labeling was carried out to check for protein loading accuracy. Western blot analysis was performed according to the standard procedure using a polyclonal rabbit anti-ENaC $\alpha$ , anti-ENaC $\gamma$ , anti-NCC (kindly pro-

vided by Jan Loffing, University of Zurich, Switzerland), and anti-pendrin (kindly provided by Régine Chambrey, Université de la Réunion, France). For quantification, the band intensities were determined (ImageJ software) and normalized by Ponceau S red intensity.

**Localization of ENaC, NCC, and AQP2 on kidney slices.** In virgin (NP) or at day 16 of pregnancy (P), anesthetized mice (10 mg/kg xylazine and 100 mg/kg ketamine) were perfused with 4% paraformaldehyde in the aorta, and the kidneys were removed and frozen in optimal cutting temperature compound (VWR). Five-micrometer-thick slices were then processed for immunofluorescence microscopy using either an anti-ENaC $\gamma$  antibody (1/400, StressMarq Biosciences) or an anti-NCC antibody (1/400, StressMarq Biosciences) or an anti-AQP2 (1/400, Santa Cruz). For each antibody, four samples (WT NP, WT P, HKA2KO NP, and HKA2KO P, 3 mice/group) were positioned on the same glass slide and treated simultaneously to permit direct comparison of signal intensity. For all slides, the pictures were taken with the same parameters of exposition and magnification ( $\times 20$ ).

**Organization of experimental procedures and statistical analysis.**

The groups of animals used to analyze expression of transporters (PCR, Western blot analysis, or immunofluorescence) were not subjected to any pharmacological treatments (thiazide or amiloride) or blood pressure measurement, were not punctured for blood collection (plasma parameters), and were not used for plasma volume measurement (Blue Evans) to avoid any possible side effects of these procedures on the results of protein or gene expression. The groups of animals used for plasma volume measurement (Blue Evans) did not undergo other procedures. BP measurements were carried out on groups of animals that did not undergo other procedures (blood collection, metabolic cages, and pharmacological treatment). Results are shown as means  $\pm$  SE. Data were tested for significance using two-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple-compar-

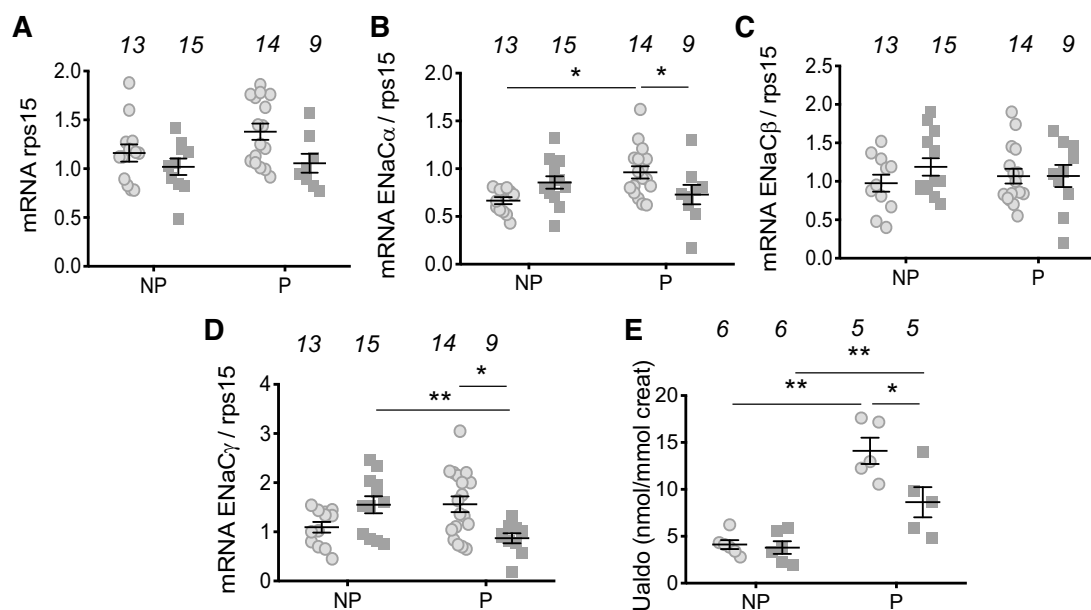


Fig. 2. Regulation of ENaC mRNA and urine aldosterone level in wild-type (WT) and H,K-ATPase type 2 knockout (HKA2KO) mice during gestation. Expression of *Rps15* (A), ENaC  $\alpha$ -subunit (B), ENaC  $\beta$ -subunit (C), ENaC  $\gamma$ -subunit (D) mRNAs and urine aldosterone level (E) in WT (circles) and HKA2KO mice (squares) under normal condition (nonpregnant, NP) or at day 16 post-coitus (pregnant, P). Results are shown as the means  $\pm$  SE. Numbers in italic equal number of mice. Two-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple-comparisons test (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ). ENaC $\alpha$  expression (B) is not impacted by the state of the mice (NP or P,  $P = 0.2232$ ), nor the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.757$ ), but by the interaction of both ( $P = 0.0035$ ). ENaC $\beta$  expression (C) is not impacted by the state of the mice (NP or P,  $P = 0.357$ ), nor by the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.912$ ), nor by the interaction of both ( $P = 0.368$ ). ENaC $\gamma$  expression (D) is not impacted by the state of the mice (NP or P,  $P = 0.495$ ), nor by the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.453$ ) but by the interaction of both ( $P = 0.0005$ ). Aldosterone level (E) is impacted by the state of the mice (NP or P,  $P < 0.01$ ), the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.014$ ), and by the interaction of both ( $P = 0.026$ ).

ison post hoc test or Student's test where appropriate (Prism Software). Outliers were tested by ROUT analysis (Prism Software).

## RESULTS

**Gestation-induced extracellular volume expansion is blunted in HKA2KO mice.** The body weight of the nonpregnant (NP) and pregnant (P) WT and HKA2KO mice were similar (Table 1), and the number of fetuses observed after euthanization of pregnant females at day 16 post-coitus was not significantly different between both genotypes (Table 1). In WT mice, the late phase of gestation was characterized by a decrease of plasma osmolality ( $331 \pm 14$  vs.  $296 \pm 5$  mosmol/kg  $H_2O$ ,  $P = 0.038$  in NP and P WT mice, respectively Fig. 1A, circles), a decrease of plasma  $Na^+$  ( $150.0 \pm 0.4$  vs.  $144.6 \pm 0.4$  mM,  $P < 0.01$  in NP and P WT mice, respectively Fig. 1B, circles), and a decrease of hematocrit ( $38.9 \pm 0.8$  vs.  $36.5 \pm 0.4\%$ ,  $P = 0.019$  in NP and P WT mice, respectively Fig. 1C, circles). To clearly characterize the volume expansion occurring during gestation, we measured it directly with the Evans blue dye dilution method and observed that plasma volume is 1.6-fold increased during gestation in WT mice ( $990 \pm 60$   $\mu$ l vs.  $1592 \pm 193$   $\mu$ l,  $P < 0.01$  in NP and P WT mice, respectively Fig. 1D, circles). All of these modifications induced by gestation are blunted in HKA2KO mice (Fig. 1, A–C, squares), whose plasma osmolality and hematocrit remain stable (compare to NP HKA2KO mice), and their plasma  $Na^+$  significantly decreases (Fig. 1B;  $146.5 \pm 0.5$  mM) but less than in WT ( $P < 0.01$ ), and their plasma volume expansion is limited and is only increased by 20% ( $1012 \pm 71$   $\mu$ l vs.  $1273 \pm 61$   $\mu$ l,  $P < 0.01$  in NP and P HKA2KO mice Fig. 1D, squares).

**ENaC expression is differentially regulated in WT and HKA2KO mice during gestation.** To understand why the HKA2KO mice did not expand their plasma volume during gestation as the WT mice did, we analyzed the expression of different renal ion transporters known to participate in the salt homeostasis by quantitative PCR (normalized by the expression of rps15, Fig. 2A), by Western blot and immunolabeling. ENaC, mediating the electrogenic  $Na^+$  reabsorption in the collecting duct is composed of three subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ). As shown in Fig. 2B, the expression of ENaC $\alpha$  is stimulated (by 40%,  $P < 0.05$ ) during gestation in kidney of pregnant WT mice (circles) but that of the HKA2KO remains similar before and during gestation (squares). Consequently, the expression level of ENaC $\alpha$  is 30% higher in pregnant WT than in pregnant HKA2KO ( $P < 0.05$ ). As for the  $\beta$ -subunit of ENaC, its mRNA expression is not modified by pregnancy and is similar in both genotypes (Fig. 2C). The ENaC $\gamma$  expression only tends to increase during pregnancy in WT mice (Fig. 2D, circles, not significant) but is significantly ( $P < 0.05$ ) decreased by 50% in pregnant vs. nonpregnant HKA2KO mice. Thus, the expression level of ENaC $\gamma$  is also much lower in pregnant HKA2KO than in pregnant WT ( $P < 0.05$ ). As shown in Fig. 2E, although urine aldosterone is increased during pregnancy in both genotypes, it is significantly lower in pregnant HKA2KO mice. When we investigated the protein expression of ENaC $\alpha$  during gestation, we confirmed that it is increased in WT pregnant mice compared with WT nonpregnant mice (Fig. 3A, both full-length 90-kDa and cleaved 30-kDa bands). In HKA2KO mice, the protein expression of the ENaC $\alpha$  is not modified by pregnancy (Fig. 3A). As for the ENaC $\gamma$ , its protein expression

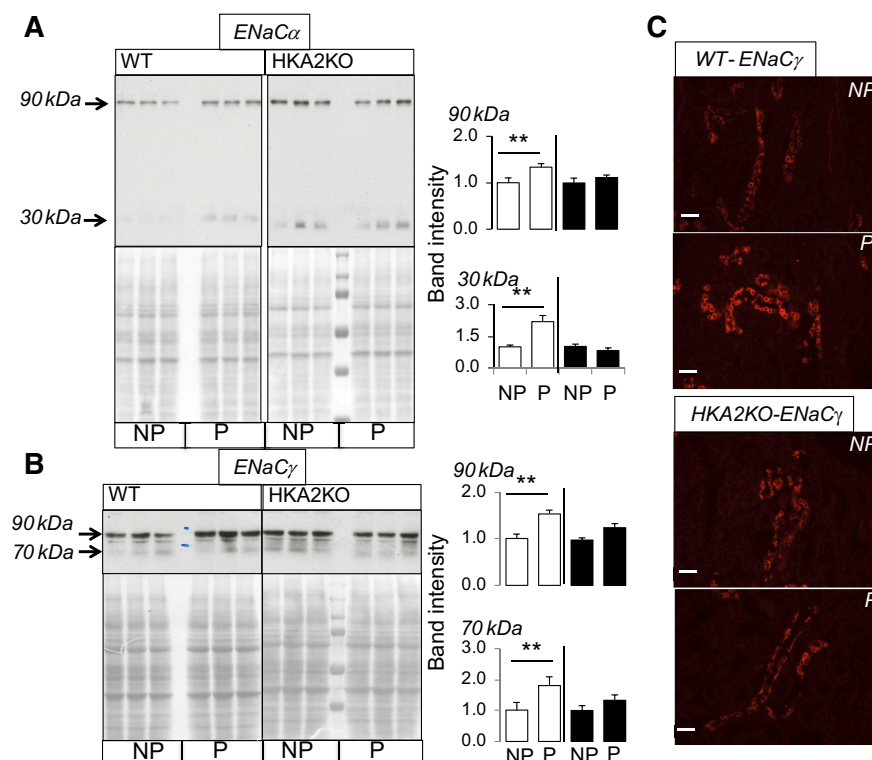


Fig. 3. Protein expression of ENaC in wild-type (WT) and H,K-ATPase type 2 knockout (HKA2KO) mice during gestation. Protein expression of the ENaC $\alpha$  (A) and ENaC $\gamma$  (B) in NP and P WT and HKA2KO mice (HKA2KO). C: immunolabeling of ENaC $\gamma$  on NP and P WT and HKA2KO mice (HKA2KO). For each antibody, four samples (WT NP, WT P, HKA2KO NP, and HKA2KO P) were positioned on the same glass slide and treated simultaneously to permit direct comparison of signal intensity. For all slides, the pictures were taken with the same parameters of exposition and magnification ( $\times 40$ ). Scale bars: 20  $\mu$ m.  $**P < 0.01$ .

is increased in pregnant WT compared with nonpregnant WT mice (Fig. 3, *B* and *C*), but it is not modified by pregnancy in HKA2KO mice (Fig. 3, *B* and *C*).

**NCC, pendrin, and NDCBE expression during gestation of WT and HKA2KO mice.** In addition to ENaC, the distal nephron also expresses two thiazide-sensitive systems of Na<sup>+</sup> reabsorption, NCC in the distal convoluted tubule (DCT) and the pendrin/NDCBE couple in the  $\beta$ -intercalated cell of the collecting duct. During gestation of WT mice, mRNA expression of NCC is decreased by 50% (Fig. 4A, circles,  $P < 0.05$ ), whereas it remains stable in HKA2KO mice (Fig. 4A, squares). The mRNA expression of pendrin is strongly increased in pregnant WT (Fig. 4B, circles,  $P < 0.01$ ), whereas it remains unchanged in HKA2KO mice. As for NDCBE, its mRNA expression is not significantly modified during gestation in any genotypes (Fig. 4C). At the protein level, the results are in good agreement with the observed change at the mRNA level since total NCC expression decreased by 50% during gestation

in WT mice but remains unchanged in HKA2KO mice (Fig. 4, *D* and *E*). Protein expression of pendrin is also strongly increased by pregnancy in WT mice and remained unchanged in HKA2KO mice (Fig. 4F).

**AQP2 expression is not differentially regulated in WT and HKA2KO mice during gestation.** We tested the possibility that the water transport system mediated by AQP2 could also be altered during pregnancy in HKA2KO compared with WT mice. As shown in Fig. 5, the expression of AQP2 (Fig. 5, *A* and *B*) and its localization (Fig. 5C) in the principal cells of the collecting ducts are similar in both genotypes, whatever the gestational status.

**HKA2KO mice exhibit urine salt loss and hypotension during pregnancy.** As shown before (30), WT or HKA2KO mice increase their food intake by 15–20% during gestation (Fig. 6A,  $P < 0.05$ ). However, in parallel, the renal excretion of Na<sup>+</sup> is not increased (Fig. 6B) in the same proportion in pregnant WT mice, characterizing the gestation-induced renal Na<sup>+</sup> retention.

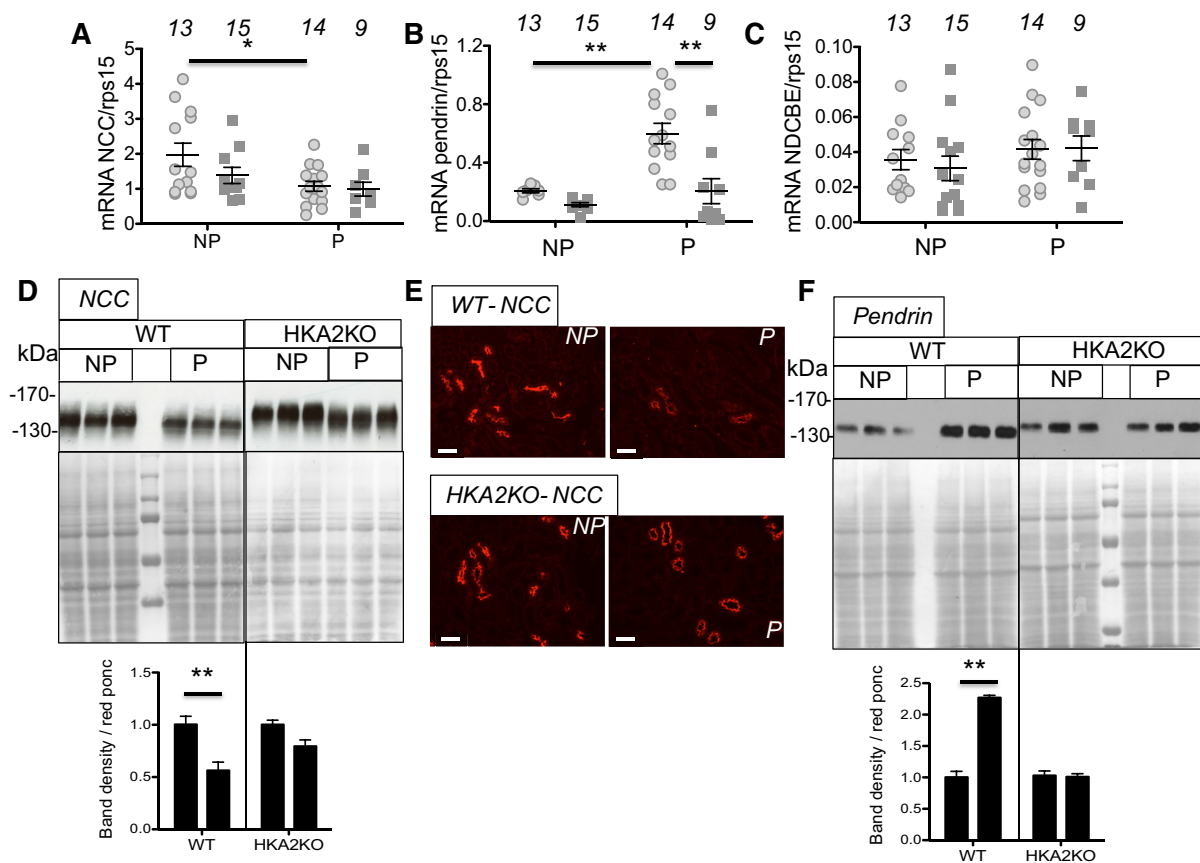


Fig. 4. Regulation of Na/Cl<sup>-</sup> cotransporter (NCC), pendrin, and Na<sup>+</sup>-driven Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger (NDCBE) in wild-type (WT) and H,K-ATPase type 2 knockout (HKA2KO) mice during gestation. Expression of NCC (A), pendrin (B), and NDCBE (C) mRNAs in WT (circles) and HKA2KO mice (HKA2 KO, squares) under normal condition (nonpregnant, NP) or at day 16 post-coitus (pregnant, P). Results are shown as the means  $\pm$  SE. Numbers in italic equals number of mice. Two-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple-comparisons test, (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ). NCC expression (A) is not impacted by the state of the mice (NP or P,  $P = 0.013$ ), nor by the genotype (WT or HKA2KO,  $P = 0.186$ ) nor by the interaction of both ( $P = 0.313$ ). Pendrin expression (B) is impacted by the state of the mice (NP or P,  $P < 0.01$ ), by the genotype (WT or HKA2KO,  $P < 0.01$ ) and by the interaction of both ( $P < 0.01$ ). NDCBE expression (C) is not impacted by the state of the mice, either by the genotype or by the interaction of both. D: protein expression of NCC in NP and P WT and HKA2KO mice (HKA2KO). E: immunolabelling of NCC on NP and P WT and HKA2KO mice (HKA2KO). For each antibody, four samples (WT NP, WT P, HKA2KO NP, and HKA2KO P) were positioned on the same glass slide and treated simultaneously to permit direct comparison of signal intensity. For all slides, the pictures were taken with the same parameters of exposition and magnification ( $\times 40$ ). Scale bars: 20  $\mu$ m. F: protein expression of pendrin in NP and P WT and HKA2KO mice (HKA2KO).

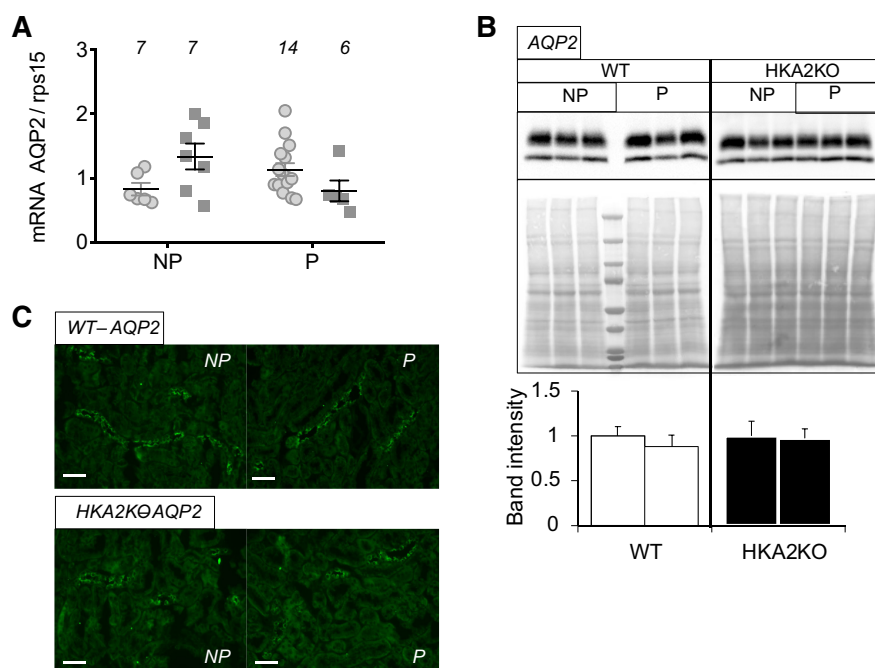


Fig. 5. Aquaporin (AQP2) expression is not modified by gestation in wild-type (WT) and H,K-ATPase type 2 knockout (HKA2KO) mice. Expression of AQP2 mRNA (A) and protein (B) in WT (circles) and HKA2KO mice (squares) under normal condition (nonpregnant, NP) or at *day 16* post-coitus (pregnant, P). Results are shown as the means  $\pm$  SE. Numbers in *italic* equal number of mice. C: immunolabeling of AQP2 on NP and P WT and HKA2KO mice. The kidney slices (WT NP, WT P, HKA2KO NP, and HKA2KO P) were positioned on the same glass slide and treated simultaneously to permit direct comparison of signal intensity. For all slides, the pictures were taken with the same parameters of exposition and magnification ( $\times 40$ ). Scale bars: 20  $\mu$ m

Conversely, the renal excretion of  $\text{Na}^+$  (Fig. 6B) is increased in pregnant HKA2KO mice ( $P < 0.05$ ), matching their food intake and revealing that they do not retain  $\text{Na}^+$  as the WT did and, therefore, do not adapt to the context of gestation. The  $\text{Na}^+$  retention induced by pregnancy in WT mice is correlated with an increased sensitivity of  $\text{Na}^+$  excretion to amiloride (by 50%,  $P < 0.05$ , Fig. 6C, circles), a result that is also in a good agreement with the increased expression of ENaC in WT pregnant mice (Figs. 2B and 3, A–C). This gestation-induced stimulation of ENaC activity is not present in HKA2KO mice (Fig. 6C, squares). Interestingly, two transport systems, NCC and the couple pendrin/NDCBE have been described as being sensitive to thiazide (21). As shown in Fig. 6D, the thiazide-sensitive  $\text{Na}^+$  excretion is not modified by pregnancy, either in

WT or in HKA2KO mice. This suggests that in WT pregnant mice, the downregulation of NCC (Fig. 4, A–E) is compensated by the upregulation of the pendrin (Fig. 4, B–F) during pregnancy in the rat, as recently proposed by West et al. (40).

*HKA2KO mice exhibit a decreased blood pressure level during pregnancy.* In nonpregnant WT and HKA2KO mice, the blood pressure (BP) is similar (117.6 vs. 114.1 mmHg, Fig. 7, *day 0*), but the inability of HKA2KO mice to expand their plasma volume during gestation compared with WT mice (because of their renal loss of  $\text{Na}^+$ ) negatively impacts their BP. Thus, in WT (circles) and HKA2KO mice (squares), the BP is significantly modified during gestation. Indeed, as shown in Fig. 7, the BP of pregnant WT mice remained similar to that measured before pregnancy (*day 0*), as already reported (12,

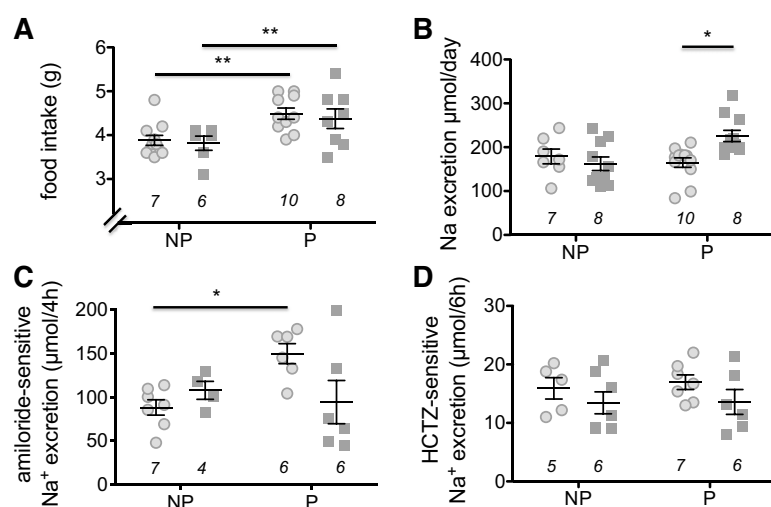


Fig. 6. Sodium balance and excretion and blood pressure (BP) level during gestation of wild-type (WT) and H,K-ATPase type 2 knockout (HKA2KO) mice. Food intake (A) and renal  $\text{Na}^+$  excretion (B) of WT (circles) and HKA2KO mice (HKA2 KO, squares) under normal condition (NP) and at *day 16* post-coitus (P). Natriuretic effects of acute amiloride treatment (4 h; C) or hydrochlorothiazide (HCTZ, 6 h; D) performed in WT and HKA2KO mice under nonpregnant (NP) and pregnant (P) states. Results are shown as the means  $\pm$  SE. Two-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple-comparisons test (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ). Food intake (A) is impacted by the state of the mice ( $P < 0.01$ ), but not by the genotype or by the interaction of both. Renal  $\text{Na}^+$  excretion (B) is impacted by the state of the mice ( $P = 0.042$ ) but not by the genotype. The interaction of both parameters affects the  $\text{Na}^+$  excretion ( $P < 0.01$ ). Amiloride sensitivity (C) is only affected by the interaction of the genotype and the state of the mice ( $P = 0.03$ ).

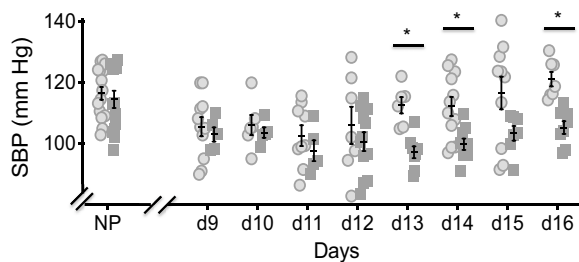


Fig. 7. Blood pressure (BP) level during gestation of wild-type (WT) and H,K-ATPase type 2 knockout (HKA2KO) mice. Systolic BP of WT (circles) and HKA2KO mice (squares) under normal condition (NP) or during gestation (day 9 to day 16 post-coitus). Results are shown as the means  $\pm$  SE. Two-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple-comparisons test ( $*P < 0.05$ ). BP is impacted by the state of the mice ( $P < 0.01$ ) and by the genotype ( $P < 0.01$ ) but not by the interaction of both.

34). However, the BP of HKA2KO mice decreased during the middle phase of gestation and remained 10 mmHg lower than that of WT mice.

## DISCUSSION

The ability to retain  $K^+$  during gestation through the activation of the HKA2 is of crucial importance since the absence of this transporter disturbs the process of fertility (30). During gestation, the HKA2KO mice exhibited a slight renal and strong intestinal loss of  $K^+$  resulting in the decrease of litter size, however, without any impact on the plasma  $[K^+]$  level (30). This was intriguing since in parallel, gestation is a physiological situation characterized by a plasma volume expansion that should lead to a dilution of the plasma components, if they are not efficiently retained. Therefore, we hypothesized that the gestational volume expansion that occurs normally in WT mice could be attenuated in HKA2KO mice.

*Will limiting plasma volume expansion avoid the development of hypokalemia?* As shown before (37, 39), the renal adaptation of the WT mice and rats to pregnancy involves the stimulation of  $Na^+$ -reabsorbing pathways in the collecting duct (ENaC and pendrin) and the downregulation of NCC expression. This situation, somehow, resembles the mechanisms observed to excrete a load of  $K^+$ , but in WT pregnant mice or rats, this process is counterbalanced by the stimulation of the HKA2 (30, 41), allowing  $K^+$  to be retained, even when ENaC is stimulated. Interestingly, in the absence of HKA2, the lack of  $K^+$  reabsorption should have resulted in a decrease of plasma  $[K^+]$ , but instead, we observed  $Na^+$  and fluid reabsorption, and in the end, it is, the size of the plasma compartment that is affected. In the absence of the HKA2, the mice are in a paradoxical situation, since they need to reduce  $K$  loss by decreasing aldosterone production and ENaC activity, whereas the increase of the vascular compartment size requires a stimulation of these systems to fill it in. This explains the limitation of the aldosterone production that we observed and is well correlated with the similar gestational phenotype observed in aldosterone synthase KO mice (34) or in pregnant rats treated with benzamil (38), in which the extracellular volume expansion is also blunted. This crosstalk between the processes controlling the plasma  $[K^+]$  and the volemia has already been observed to protect male mice under dietary  $K^+$  restriction against the development of hypokalemia (35). Indeed, in the

absence of the HKA2, male mice on a low- $K^+$  diet for a short period of time display a renal loss of  $Na^+$  and fluid that has been partially attributed to a blockade of the vasopressin action. This eventually contributes to a reduction of the plasma compartment size (by 20%) and lead to hypotension. The water transport system of the collecting duct, based on AQP2 expression analysis, does not seem disturbed, either in normal pregnancy of WT mice, which is different of what has been observed in rat (28) or in HKA2KO mice. Here, our results rather suggest that in pregnant mice, the lack of HKA2 contributes to a renal loss of fluid through the inappropriate regulation of ENaC (which is not stimulated in pregnant HKA2KO mice). The mechanisms by which this blunted stimulation of ENaC takes place in HKA2KO mice are not known, but they may be related to preservation of the plasma  $[K^+]$ , avoiding an excess of  $K^+$  secretion through the principal cells of the collecting duct. In parallel, this impaired stimulation of ENaC would also result in an inappropriate  $Na^+$  retention, impeding the normal extracellular volume expansion. Since the HKA2 is strongly expressed in colon, we cannot exclude that the effects observed in the KO mice are linked to a fecal loss of  $K^+$ . However, whatever the origin of the  $K^+$  balance disturbance, it requires a renal adaptation that leads to the observed gestational phenotypes.

We propose that these two effects protect the organism against the development of hypokalemia, by limiting the  $K^+$  loss in the urine and reducing the plasma volume. Indeed, if the HKA2KO mice expand their plasma volume as their WT littermate do, their plasma  $[K^+]$  level should decrease by 25%, which would result in a severe hypokalemia.

*Is HKA2 a putative target to deal with blood pressure modification during the pregnancy?* Therefore, the HKA2 appears to be at a crossroad between the regulation of  $K^+$ ,  $Na^+$  and water metabolism. Its absence during pregnancy leads to compensatory mechanisms that tend to preserve plasma  $[K^+]$  level but that leads to hypotension. Interestingly, chronic hypotension during gestation is observed in 2–3% of the pregnancies and is associated with a higher rate of threatened abortion, higher occurrence of severe nausea, or vomiting and anemia (2). It would be interesting to investigate whether a low blood pressure during gestation could be related to polymorphisms in the *Atp12a* gene encoding the catalytic subunit of the HKA2.

Conversely, the identification of the HKA2 as a possible target to reduce blood pressure during pregnancy may also be interesting in the context of gestational hypertension and more particularly during preeclampsia. The volemia status of preeclamptic patient remains controversial, perhaps because this disease is heterogeneous with at least two different components, an early- and a late-onset preeclampsia. Late-onset preeclampsia has been correlated with an increase of total body fluid (18) and plasma volume (31, 32). In this context, inhibition of HKA2 could be an interesting therapeutic approach to help decrease BP. The pharmacology of the HKA2 is complicated and has not been fully investigated (for a review, see Ref. 9). However, some data exist in the literature that suggest that the HKA2 may be inhibited by "proton-pump inhibitors" (PPIs) of the omeprazole family (11, 20, 23, 36). These compounds are well known to inhibit the H,K-ATPase type 1, which is structurally and functionally closely related to the HKA2. Recently, these compounds have been proposed to

reduce the level of blood pressure in a model of preeclamptic mice (29). In this article, the authors did not formerly identify the target of omeprazole in this pathological context. Interestingly, PPIs were also shown to reduce blood pressure in hypertensive patients (19). In light of our own results, we propose that omeprazole may inhibit the HKA2 in the preeclamptic patients, leading to a modification of the  $K^+$ ,  $Na^+$ , and water balances and, thus, favoring a decrease in plasma volume and blood pressure. This hypothesis needs to be investigated further.

#### Perspectives and Significance

The results of this study establish that the correct expansion of the plasma volume during pregnancy requires the presence of an active HKA2. Indeed, the absence of the HKA2 in pregnant mice, which is already known to promote intestinal and renal  $K^+$  leaks (30), results in a reduced volemic expansion, allowing the concentration of  $K^+$  in the extracellular compartment to limit the development of hypokalemia. The consequence of this “underfilled” situation is a lowering of the blood pressure during the late phase of the gestation. The HKA2 appears, therefore, to be a key ion transporter in the physiological adaptation to gestation that controls both  $K^+$  and  $Na^+$  metabolisms.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Physiological analysis has been performed with the help of Gaelle Brideau and Nadia Frachon from the “plateforme d’exploration fonctionnelle du petit animal” of the team “Physiologie Rénale and Tubulopathies” at the Centre de Recherche des Cordeliers. We are grateful for the technical assistance of the CEF crews in the management of our colony of mice.

#### GRANTS

This study was supported by recurrent grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). It was also supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, project DPC20171138949).

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.C. conceived and designed research; C.W., C.R., S.L., S.B., and A.S. performed experiments; C.W., C.R., A.S., and G.C. analyzed data; C.W., C.R., S.L., and G.C. interpreted results of experiments; G.C. prepared figures; G.C. drafted manuscript; C.R. and A.S. edited and revised manuscript; C.R. and G.C. approved final version of manuscript.

#### REFERENCES

- Asano S, Hoshina S, Nakaie Y, Watanabe T, Sato M, Suzuki Y, Takeguchi N. Functional expression of putative  $H^+K^+$ -ATPase from guinea pig distal colon. *Am J Physiol* 275: C669–C674, 1998. doi:10.1152/ajpcell.1998.275.3.C669.
- Bánhidly F, Acs N, Puhó EH, Czeizel AE. Hypotension in pregnant women: a population-based case-control study of pregnancy complications and birth outcomes. *Hypertens Res* 34: 55–61, 2011. doi:10.1038/hr.2010.172.
- Barron WM, Stamoutsos BA, Lindheimer MD. Role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat. *J Clin Invest* 73: 923–932, 1984. doi:10.1172/JCI111316.
- Burnay M, Crambert G, Kharoubi-Hess S, Geering K, Horisberger JD. *Bifo marinus* bladder H-K-ATPase carries out electroneutral ion transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F869–F874, 2001. doi:10.1152/ajprenal.2001.281.5.F869.
- Codina J, Pressley TA, DuBose TD Jr. The colonic  $H^+K^+$ -ATPase functions as a  $Na^+$ -dependent  $K^+(NH_4^+)$ -ATPase in apical membranes from rat distal colon. *J Biol Chem* 274: 19693–19698, 1999. doi:10.1074/jbc.274.28.19693.
- Cole JM, Khokhlova N, Sutliff RL, Adams JW, Disher KM, Zhao H, Capecchi MR, Corvol P, Bernstein KE. Mice lacking endothelial ACE: normal blood pressure with elevated angiotensin II. *Hypertension* 41: 313–321, 2003. doi:10.1161/01.HYP.0000050650.52007.83.
- Cougnon M, Bouyer P, Planelles G, Jaisser F. Does the colonic H,K-ATPase also act as an Na,K-ATPase? *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6516–6520, 1998. doi:10.1073/pnas.95.11.6516.
- Cougnon M, Planelles G, Crowson MS, Shull GE, Rossier BC, Jaisser F. The rat distal colon P-ATPase alpha subunit encodes a ouabain-sensitive  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase. *J Biol Chem* 271: 7277–7280, 1996. doi:10.1074/jbc.271.13.7277.
- Crambert G. H-K-ATPase type 2: relevance for renal physiology and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F693–F700, 2014. doi:10.1152/ajprenal.00605.2013.
- Crambert G, Horisberger JD, Modyanov NN, Geering K. Human nongastric  $H^+K^+$ -ATPase: transport properties of ATP1a1 assembled with different beta-subunits. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C305–C314, 2002. doi:10.1152/ajpcell.00590.2001.
- Delpiano L, Thomas JJ, Yates AR, Rice SJ, Gray MA, Saint-Criq V. Esomeprazole increases airway surface liquid pH in primary cystic fibrosis epithelial cells. *Front Pharmacol* 9: 1462, 2018. doi:10.3389/fphar.2018.01462.
- Doridot L, Passet B, Méhats C, Rigourd V, Barboux S, Ducat A, Mondon F, Vilotte M, Castille J, Breuille-Fouché M, Daniel N, le Provost F, Bauchet AL, Baudrie V, Hertig A, Buffat C, Simeoni U, Germain G, Vilotte JL, Vaiman D. Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment. *Hypertension* 61: 662–668, 2013. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.202994.
- Durr JA, Stamoutsos B, Lindheimer MD. Osmoregulation during pregnancy in the rat. Evidence for resetting of the threshold for vasopressin secretion during gestation. *J Clin Invest* 68: 337–346, 1981. doi:10.1172/JCI110261.
- Edwards A, Crambert G. Versatility of NaCl transport mechanisms in the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 313: F1254–F1263, 2017. doi:10.1152/ajprenal.00369.2017.
- Elabida B, Edwards A, Salhi A, Azroyan A, Fodstad H, Meneton P, Doucet A, Bloch-Faure M, Crambert G. Chronic potassium depletion increases adrenal progesterone production that is necessary for efficient renal retention of potassium. *Kidney Int* 80: 256–262, 2011. doi:10.1038/ki.2011.15.
- Geering K, Crambert G, Yu C, Korneenko TV, Pestov NB, Modyanov NN. Intersubunit interactions in human X,K-ATPases: role of membrane domains M9 and M10 in the assembly process and association efficiency of human, nongastric H,K-ATPase alpha subunits (ATP1a1) with known beta subunits. *Biochemistry* 39: 12688–12698, 2000. doi:10.1021/bi0009791.
- Grimont A, Bloch-Faure M, El Abida B, Crambert G. Mapping of sex hormone receptors and their modulators along the nephron of male and female mice. *FEBS Lett* 583: 1644–1648, 2009. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.032.
- Gyselaers W, Vonck S, Staelens AS, Lanssens D, Tomsin K, Oben J, Dreesen P, Bruckers L. Body fluid volume homeostasis is abnormal in pregnancies complicated with hypertension and/or poor fetal growth. *PLoS One* 13: e0206257, 2018. doi:10.1371/journal.pone.0206257.
- Joya-Vazquez P, Bacaicoa MA, Velasco R, Chicon JL, Trejo S, Carrasco MA, Robles NR, Munoz-Torrero JFS. Proton-pump inhibitors therapy and blood pressure control. *Intern J Pharmacol Res* 4: 142–147, 2014. doi:10.7439/ijpr.v4i3.116.
- Lameris AL, Hess MW, van Kruijsbergen I, Hoenderop JG, Bindels RJ. Omeprazole enhances the colonic expression of the  $Mg^{2+}$  transporter TRPM6. *Pflugers Arch* 465: 1613–1620, 2013. doi:10.1007/s00424-013-1306-0.
- Leviel F, Hübner CA, Houillier P, Morla L, El Moghrabi S, Brideau G, Hassan H, Parker MD, Kurth I, Kougioumtzes A, Sinning A, Pech V, Rimondy KA, Miller RL, Hummler E, Shull GE, Aronson PS, Doucet A, Wall SM, Chambrey R, Eladari D. The  $Na^+$ -dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral  $Na^+$  reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J Clin Invest* 120: 1627–1635, 2010. doi:10.1172/JCI40145.
- Meneton P, Schultheis PJ, Greeb J, Nieman ML, Liu LH, Clarke LL, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Shull GE. Increased sensitivity to

- K<sup>+</sup> deprivation in colonic H,K-ATPase-deficient mice. *J Clin Invest* 101: 536–542, 1998. doi:10.1172/JCI1720.
23. Min JY, Ocampo CJ, Stevens WW, Price CPE, Thompson CF, Homma T, Huang JH, Norton JE, Suh LA, Pothoven KL, Conley DB, Welch KC, Shintani-Smith S, Peters AT, Grammer LC III, Harris KE, Hulse KE, Kato A, Modyanov NN, Kern RC, Schleimer RP, Tan BK. Proton pump inhibitors decrease eotaxin-3/CCL26 expression in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: Possible role of the nongastric H,K-ATPase. *J Allergy Clin Immunol* 139: 130–141.e11, 2017. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.020.
  24. Morgan TK, Rohrwasser A, Zhao L, Hillas E, Cheng T, Ward KJ, Lalouel JM. Hypervolemia of pregnancy is not maintained in mice chronically overexpressing angiotensinogen. *Am J Obstet Gynecol* 195: 1700–1706, 2006. doi:10.1016/j.ajog.2006.04.005.
  25. Morla L, Brideau G, Fila M, Crambert G, Cheval L, Houillier P, Ramakrishnan S, Imbert-Teboul M, Doucet A. Renal proteinase-activated receptor 2, a new actor in the control of blood pressure and plasma potassium level. *J Biol Chem* 288: 10124–10131, 2013. doi:10.1074/jbc.M112.446393.
  26. Morla L, Doucet A, Lamouroux C, Crambert G, Edwards A. The renal cortical collecting duct: a secreting epithelium? *J Physiol* 594: 5991–6008, 2016. doi:10.1113/JP272877.
  27. Nakamura S, Amlal H, Galla JH, Soleimani M. Colonic H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase is induced and mediates increased HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> reabsorption in inner medullary collecting duct in potassium depletion. *Kidney Int* 54: 1233–1239, 1998. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00105.x.
  28. Ohara M, Martin PY, Xu DL, St John J, Pattison TA, Kim JK, Schrier RW. Upregulation of aquaporin 2 water channel expression in pregnant rats. *J Clin Invest* 101: 1076–1083, 1998. doi:10.1172/JCI649.
  29. Onda K, Tong S, Beard S, Binder N, Muto M, Senadheera SN, Parry L, Dilworth M, Renshall L, Brownfoot F, Hastie R, Tuohey L, Palmer K, Hirano T, Ikawa M, Kaitu'u-Lino T, Hannan NJ. Proton pump inhibitors decrease soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin secretion, decrease hypertension, and rescue endothelial dysfunction. *Hypertension* 69: 457–468, 2017 [Erratum in *Hypertension* 71: e11, 2018]. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08408.
  30. Salhi A, Lamouroux C, Pestov NB, Modyanov NN, Doucet A, Crambert G. A link between fertility and K<sup>+</sup> homeostasis: role of the renal H,K-ATPase type 2. *Pflugers Arch* 465: 1149–1158, 2013. doi:10.1007/s00424-013-1252-x.
  31. Schrier RW, Briner VA. Peripheral arterial vasodilation hypothesis of sodium and water retention in pregnancy: implications for pathogenesis of preeclampsia-eclampsia. *Obstet Gynecol* 77: 632–639, 1991.
  32. Stergiotou I, Crispi F, Valenzuela-Alcaraz B, Bijns B, and Gratacos E. Patterns of maternal vascular remodeling and responsiveness in early-versus late-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 209: 558e1–558e14, 2013. doi:10.1016/j.ajog.2013.07.030.
  33. Swarts HG, Koenderink JB, Willems PH, De Pont JJ. The non-gastric H,K-ATPase is oligomycin-sensitive and can function as an H<sup>+</sup>,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 280: 33115–33122, 2005. doi:10.1074/jbc.M504535200.
  34. Todkar A, Di Chiara M, Loffing-Cueni D, Bettoni C, Mohaupt M, Loffing J, Wagner CA. Aldosterone deficiency adversely affects pregnancy outcome in mice. *Pflugers Arch* 464: 331–343, 2012. doi:10.1007/s00424-012-1145-4.
  35. Walter C, Tanfous MB, Igoudjil K, Salhi A, Escher G, Crambert G. H,K-ATPase type 2 contributes to salt-sensitive hypertension induced by K<sup>+</sup> restriction. *Pflugers Arch* 468: 1673–1683, 2016. doi:10.1007/s00424-016-1872-z.
  36. Watanabe T, Suzuki T, Suzuki Y. Ouabain-sensitive K<sup>+</sup>-ATPase in epithelial cells from guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 258: G506–G511, 1990. doi:10.1152/ajpgi.1990.258.4.G506.
  37. West C, Zhang Z, Ecker G, Masilamani SM. Increased renal  $\alpha$ -epithelial sodium channel (ENAC) protein and increased ENAC activity in normal pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1326–R1332, 2010. doi:10.1152/ajpregu.00082.2010.
  38. West CA, Han W, Li N, Masilamani SM. Renal epithelial sodium channel is critical for blood pressure maintenance and sodium balance in the normal late pregnant rat. *Exp Physiol* 99: 816–823, 2014. doi:10.1113/expphysiol.2013.076273.
  39. West CA, McDonough AA, Masilamani SM, Verlander JW, Baylis C. Renal NCC is unchanged in the midpregnant rat and decreased in the late pregnant rat despite avid renal Na<sup>+</sup> retention. *Am J Physiol Renal Physiol* 309: F63–F70, 2015. doi:10.1152/ajprenal.00147.2015.
  40. West CA, Verlander JW, Wall SM, Baylis C. The chloride-bicarbonate exchanger pendrin is increased in the kidney of the pregnant rat. *Exp Physiol* 100: 1177–1186, 2015. doi:10.1113/EP085396.
  41. West CA, Welling PA, West DA Jr, Coleman RA, Cheng KY, Chen C, DuBose TD Jr, Verlander JW, Baylis C, Gumz ML. Renal and colonic potassium transporters in the pregnant rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 314: F251–F259, 2018. doi:10.1152/ajprenal.00288.2017.



# CONCLUSION

En conclusion, ce projet de thèse aura permis de mieux comprendre certains mécanismes mis en place par notre organisme afin de maintenir une kaliémie stable, notamment en réponse à une restriction potassique et lors de la gestation. GDF15 s'avère être un acteur essentiel à l'adaptation rénale et extrarénale de notre corps en réponse à un régime faible en  $K^+$ . Son absence empêche la rétention rénale de  $K^+$  et impacte le relargage musculaire de  $K^+$ , provoquant une hypokaliémie. Durant la gestation, la rétention rénale de  $K^+$  est altérée en absence de la HKA2, mais les souris gravides se protègent de l'hypokaliémie grâce à une réduction de leur volume extracellulaire.

Afin de compléter nos connaissances sur les mécanismes mis en place pour maintenir une kaliémie stable, des études supplémentaires sont nécessaires. Pour rappel, des données non publiées par notre laboratoire ont démontré que, dans le cadre d'une restriction potassique, l'absence de HKA2 empêche la prolifération des cellules intercalaires de type A. Il serait intéressant d'étudier par quel processus l'absence de HKA2 bloque la prolifération, notamment si cela est lié à GDF15.

Il a été publié dans la littérature que l'expression de GDF15 est augmentée lors de la grossesse (Wischhusen, Melero and Fridman, 2020). On peut se poser la question de savoir si la rétention de  $K^+$  lors de la gestation se fait également par une prolifération des cellules intercalaires de type A de manière GDF15-dépendante.

Enfin, il serait intéressant d'étudier l'implication de GDF15 dans le cadre d'hypokaliémies chroniques induites par des pathologies comme le syndrome de Gittelman, avec le développement de modèles murins reproduisant la maladie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acker, C.G. *et al.* (1998) 'Hyperkalemia in Hospitalized Patients: Causes, Adequacy of Treatment, and Results of an Attempt to Improve Physician Compliance With Published Therapy Guidelines', *Archives of Internal Medicine*, 158(8), p. 917. Available at: <https://doi.org/10.1001/archinte.158.8.917>.
- Alappan, R. (1996) 'Hyperkalemia in Hospitalized Patients Treated with Trimethoprim-Sulfamethoxazole', *Annals of Internal Medicine*, 124(3), p. 316. Available at: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-124-3-199602010-00006>.
- Almomani, E. *et al.* (2014) 'Intercalated Cells: More than pH Regulation', *Diseases*, 2(2), pp. 71–92. Available at: <https://doi.org/10.3390/diseases2020071>.
- Amin, N. *et al.* (2013) 'Pseudohypoaldosteronism type 1: clinical features and management in infancy', *Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports*, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1530/EDM-13-0010>.
- Amorim, J.B.O. *et al.* (2004) 'Signaling path of the action of AVP on distal K<sup>+</sup> secretion', *Kidney International*, 66(2), pp. 696–704. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00800.x>.
- Asher, C. *et al.* (1996) 'Aldosterone-induced increase in the abundance of Na<sup>+</sup> channel subunits', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(2), pp. C605–C611. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.2.C605>.
- Assadi, A., Zahabi, A. and Hart, R.A. (2020) 'GDF15, an update of the physiological and pathological roles it plays: a review', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472(11), pp. 1535–1546. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02459-1>.
- de Baaij, J.H.F., Hoenderop, J.G.J. and Bindels, R.J.M. (2012) 'Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease', *Clinical Kidney Journal*, 5(Suppl 1), pp. i15–i24. Available at: <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfr164>.
- Baek, S.J. *et al.* (2004) 'Expression of NAG-1, a Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily Member, by Troglitazone Requires the Early Growth Response Gene EGR-1', *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), pp. 6883–6892. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M305295200>.
- Baek, S.J., Horowitz, J.M. and Eling, T.E. (2001) 'Molecular Cloning and Characterization of Human Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-activated Gene Promoter', *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), pp. 33384–33392. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M101814200>.
- Bastani, B. *et al.* (1991) 'Expression and distribution of renal vacuolar proton-translocating adenosine triphosphatase in response to chronic acid and alkali loads in the rat.', *Journal of*

*Clinical Investigation*, 88(1), pp. 126–136. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI115268>.

Bauskin, A.R. *et al.* (2010) ‘The TGF- $\beta$  Superfamily Cytokine MIC-1/GDF15: Secretory Mechanisms Facilitate Creation of Latent Stromal Stores’, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 30(6), pp. 389–397. Available at: <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0052>.

Baz, E.M.K. *et al.* (2002) ‘An unusual case of hyperkalaemia-induced cardiac arrest in a paediatric patient during transfusion of a “fresh” 6-day-old blood unit’, *Transfusion Medicine*, 12(6), pp. 383–386. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2002.00402.x>.

Bazúa-Valenti, S. *et al.* (2014) ‘The Effect of WNK4 on the Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride’, *J Am Soc Nephrol* [Preprint].

Berl, T. *et al.* (1977) ‘On the Mechanism of Polyuria in Potassium Depletion’, *Journal of Clinical Investigation*, 60(3), pp. 620–625. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI108813>.

Bertog, M. *et al.* (2008) ‘Aldosterone responsiveness of the epithelial sodium channel (ENaC) in colon is increased in a mouse model for Liddle’s syndrome: ENaC in a mouse model for Liddle’s syndrome’, *The Journal of Physiology*, 586(2), pp. 459–475. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.140459>.

Blanchard, A., Brailly Tabard, S., *et al.* (2020) ‘Adrenal adaptation in potassium-depleted men: role of progesterone?’, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 35(11), pp. 1901–1908. Available at: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz135>.

Blanchard, A., Courand, P.-Y., *et al.* (2020) ‘Syndromes de Bartter–Gitelman’, *Néphrologie & Thérapeutique*, 16(4), pp. 233–243. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2020.06.001>.

Bomszyk, K. and Wright, F.S. (1986) ‘Dependence of ion fluxes on fluid transport by rat proximal tubule’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 250(4), pp. F680–F689. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1986.250.4.F680>.

Bootcov, M.R. *et al.* (1997) ‘MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- $\beta$  superfamily’, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, p. 6.

Böttner, M. *et al.* (1999) ‘Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1)’, *Gene*, 237(1), pp. 105–111.

Breit, S.N., Brown, D.A. and Tsai, V.W.-W. (2021) ‘The GDF15-GFRAL Pathway in Health and Metabolic Disease: Friend or Foe?’, *Annual Review of Physiology*, 83(1), pp. 127–151. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022020-045449>.

Brown, D., Hirscht, S. and Gluck, S. (1988) ‘An H<sup>+</sup>-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations’, *Nature*, 331(6157), pp. 622–624. Available at: <https://doi.org/10.1038/331622a0>.

- Burnay, M. *et al.* (2001) 'Bufo marinus bladder H-K-ATPase carries out electroneutral ion transport', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 281(5), pp. F869–F874. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.5.F869>.
- Carrisoza-Gaytan, R. *et al.* (2016) 'An unexpected journey: conceptual evolution of mechanoregulated potassium transport in the distal nephron', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 310(4), pp. C243–C259. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00328.2015>.
- Cassola, A.C., Giebisch, G. and Wang, W. (1993) 'Vasopressin increases density of apical low-conductance K<sup>+</sup> channels in rat CCD', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 264(3), pp. F502–F509. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.264.3.F502>.
- Chai, Y.L. *et al.* (2016) 'Growth differentiation factor-15 and white matter hyperintensities in cognitive impairment and dementia', *Medicine*, 95(33), p. e4566. Available at: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004566>.
- Cheval, L. *et al.* (2004) 'Plasticity of mouse renal collecting duct in response to potassium depletion', *Physiological Genomics*, 19(1), pp. 61–73. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00055.2004>.
- Cheval, L. *et al.* (2021) 'Acidosis-induced activation of distal nephron principal cells triggers Gdf15 secretion and adaptive proliferation of intercalated cells', *Acta Physiologica*, 232(3). Available at: <https://doi.org/10.1111/apha.13661>.
- Choi, C.S. *et al.* (2001) 'Short-term K<sup>+</sup> deprivation provokes insulin resistance of cellular K<sup>+</sup> uptake revealed with the K<sup>+</sup> clamp', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 280(1), pp. F95–F102. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.1.F95>.
- Chrysovergis, K. *et al.* (2014) 'NAG-1/GDF-15 prevents obesity by increasing thermogenesis, lipolysis and oxidative metabolism', *International Journal of Obesity*, 38(12), pp. 1555–1564. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.27>.
- Chung, H.K. *et al.* (2017) 'Growth differentiation factor 15 is a myomitokine governing systemic energy homeostasis', *Journal of Cell Biology*, 216(1), pp. 149–165. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201607110>.
- Coca, S.G., Perazella, M.A. and Buller, G.K. (2005) 'The cardiovascular implications of hypokalemia', *American Journal of Kidney Diseases*, 45(2), pp. 233–247. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.10.015>.
- Cohen, J.D. *et al.* (1987) 'Diuretics, serum potassium and ventricular arrhythmias in the Multiple Risk Factor Intervention Trial', *The American Journal of Cardiology*, 60(7), pp. 548–554. Available at: [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(87\)90303-1](https://doi.org/10.1016/0002-9149(87)90303-1).

- Coll, A.P. *et al.* (2020) ‘GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance’, *Nature*, 578(7795), pp. 444–448. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1911-y>.
- Coussens, L. (1985) ‘Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene’, *Science*, 23, p. 1132.
- Crambert, G. (2014) ‘H-K-ATPase type 2: relevance for renal physiology and beyond’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306(7), pp. F693–F700. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00605.2013>.
- Crop, M.J. *et al.* (2007) ‘Hypokalaemia and subsequent hyperkalaemia in hospitalized patients’, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(12), pp. 3471–3477. Available at: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm471>.
- Day, E.A. *et al.* (2019) ‘Metformin-induced increases in GDF15 are important for suppressing appetite and promoting weight loss’, *Nature Metabolism*, 1(12), pp. 1202–1208. Available at: <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0146-4>.
- Diekmann, F. *et al.* (2001) ‘Hypokalemic nephropathy after pelvic pouch procedure and protective loop ileostomy’, *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 39(8), pp. 579–582. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2001-16691>.
- Doucet, A. and Crambert, G. (2015) *Potassium homeostasis, Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. Oxford: Oxford University Press. Available at: <https://doi.org/10.1093/med/9780199592548.003.0023>.
- DuBose, T.D. and Good, D.W. (1992) ‘Chronic hyperkalemia impairs ammonium transport and accumulation in the inner medulla of the rat.’, *Journal of Clinical Investigation*, 90(4), pp. 1443–1449. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI116011>.
- Edmonds, C.J. (1981) ‘Amiloride sensitivity of the transepithelial electrical potential and of sodium and potassium transport in rat distal colon in vivo.’, *The Journal of Physiology*, 313(1), pp. 547–559. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013681>.
- Einhorn, L.M. *et al.* (2009) ‘The Frequency of Hyperkalemia and Its Significance in Chronic Kidney Disease’, *Archives of Internal Medicine*, 169(12), p. 1156. Available at: <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.132>.
- El Moghrabi, S. *et al.* (2010) ‘Tissue kallikrein permits early renal adaptation to potassium load’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30), pp. 13526–13531. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913070107>.
- Elabida, B. *et al.* (2011) ‘Chronic potassium depletion increases adrenal progesterone production that is necessary for efficient renal retention of potassium’, *Kidney International*,

80(3), pp. 256–262. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.2011.15>.

Elalouf, J.M., Roinel, N. and de Rouffignac, C. (1985) ‘Effects of dDAVP on rat juxtamedullary nephrons: stimulation of medullary K recycling’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 249(2), pp. F291–F298. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1985.249.2.F291>.

Elger, M., Bankir, L. and Kriz, W. (1992) ‘Morphometric analysis of kidney hypertrophy in rats after chronic potassium depletion’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 262(4), pp. F656–F667. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1992.262.4.F656>.

Elkjær, M.-L. *et al.* (2002) ‘Altered expression of renal NHE3, TSC, BSC-1, and ENaC subunits in potassium-depleted rats’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 283(6), pp. F1376–F1388. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00186.2002>.

Emmerson, P.J. *et al.* (2018) ‘GDF15 and Growth Control’, *Frontiers in Physiology*, 9, p. 1712. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01712>.

Epple, H.J. *et al.* (2000) ‘Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278(5), pp. G718–G724. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.5.G718>.

Estilo, G. *et al.* (2008) ‘Effect of aldosterone on BK channel expression in mammalian cortical collecting duct’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 295(3), pp. F780–F788. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00002.2008>.

Eustache, G. *et al.* (2020) ‘Hypokaliémie avec pseudo-hyperaldostéronisme : est-ce un syndrome de Lidl® ?’, *Néphrologie & Thérapeutique*, 16(4), pp. 225–231. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2020.03.008>.

Field, Michael J, Stanton, B.A. and Giebisch, G.H. (1984) ‘Differential Acute Effects of Aldosterone, Dexamethasone, and Hyperkalemia on Distal Tubular Potassium Secretion in the Rat Kidney’.

Field, Michael J., Stanton, B.A. and Giebisch, G.H. (1984) ‘Influence of ADH on renal potassium handling: A micropuncture and microperfusion study’, *Kidney International*, 25(3), pp. 502–511. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.1984.46>.

Foster, E.S., Hayslett, J.P. and Binder, H.J. (1984) ‘Mechanism of active potassium absorption and secretion in the rat colon’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 246(5), pp. G611–G617. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1984.246.5.G611>.

Frederick, I.O. *et al.* (2005) ‘Dietary fiber, potassium, magnesium and calcium in relation to the risk of preeclampsia.’, *The Journal of reproductive medicine*, 50(5), pp. 332–344.

- Freeman, S.J. and Fale, A.D. (1993) 'MUSCULAR PARALYSIS AND VENTILATORY FAILURE CAUSED BY HYPERKALAEMIA', *British Journal of Anaesthesia*, 70(2), pp. 226–227. Available at: <https://doi.org/10.1093/bja/70.2.226>.
- Gerstein, H.C. *et al.* (2017) 'Growth Differentiation Factor 15 as a Novel Biomarker for Metformin', *Diabetes Care*, 40(2), pp. 280–283. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc16-1682>.
- Giebisch (2013) *Seldin and Giebisch's the kidney: physiology & pathophysiology*. Fifth edition. Amsterdam: Elsevier/AP.
- Greger, R. (1985) 'Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron.', *Physiological Reviews*, 65(3), pp. 760–797. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.1985.65.3.760>.
- Hafner, P. *et al.* (2008) 'Pendrin in the mouse kidney is primarily regulated by Cl<sup>-</sup> excretion but also by systemic metabolic acidosis', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(6), pp. C1658–C1667. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00419.2008>.
- Hale, C. and Véniant, M.M. (2021) 'Growth differentiation factor 15 as a potential therapeutic for treating obesity', *Molecular Metabolism*, 46, p. 101117. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101117>.
- Hanna, R.M. *et al.* (2022) 'Calcium Transport in the Kidney and Disease Processes', *Frontiers in Endocrinology*, 12, p. 762130. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.762130>.
- Harris, R.C. (2002) 'Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology', *The American Journal of Cardiology*, 89(6), pp. 10–17. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02232-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02232-4).
- Hayashi, M. and Katz, A.I. (1987) 'The kidney in potassium depletion. II. K<sup>+</sup> handling by the isolated perfused rat kidney', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 252(3), pp. F447–F452. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1987.252.3.F447>.
- Ho, J.M.-W., Juurlink, D.N. and Cavalcanti, R.B. (2010) 'Hypokalemia Following Polyethylene Glycol–Based Bowel Preparation for Colonoscopy in Older Hospitalized Patients with Significant Comorbidities', *Annals of Pharmacotherapy*, 44(3), pp. 466–470. Available at: <https://doi.org/10.1345/aph.1M341>.
- Hromas, R. *et al.* (1997) 'PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1354(1), pp. 40–44. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00122-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00122-X).
- Hsiao, E.C. *et al.* (2000) 'Characterization of Growth-Differentiation Factor 15, a Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily Member Induced following Liver Injury', *MOL. CELL. BIOL.*,

20, p. 10.

Hunter, R.W. and Bailey, M.A. (2019) 'Hyperkalemia: pathophysiology, risk factors and consequences', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 34(Supplement\_3), pp. iii2–iii11. Available at: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz206>.

Ichai, C. (2010) 'Dyskaliémies', in J.-J. Lehot and C.-C. Arvieux (eds) *Réanimation et urgences*. Paris: Springer Paris, pp. 171–177. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-2-287-99129-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-2-287-99129-5_8).

Iervolino, A. *et al.* (2020) 'Potassium depletion induces cellular conversion in the outer medullary collecting duct altering Notch signaling pathway', *Scientific Reports*, 10(1), p. 5708. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61882-7>.

Jamison, R.L. (1987) 'Potassium recycling', *Kidney International*, 31(3), pp. 695–703. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.1987.54>.

Jiang, J. *et al.* (2018) 'A Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies of Growth Differentiation Factor-15 Concentration in Blood', *Frontiers in Genetics*, 9, p. 97. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00097>.

Jiang, J., Wen, W. and Sachdev, P.S. (2016) 'Macrophage inhibitory cytokine-1/growth differentiation factor 15 as a marker of cognitive ageing and dementia', *Current Opinion in Psychiatry*, 29(2), pp. 181–186. Available at: <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000225>.

Johnen, H. *et al.* (2007) 'Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1', *Nature Medicine*, 13(11), pp. 1333–1340. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1677>.

Jones, J.E. *et al.* (2018) 'Supraphysiologic Administration of GDF11 Induces Cachexia in Part by Upregulating GDF15', *Cell Reports*, 22(6), pp. 1522–1530. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.044>.

Joshi, J.P. *et al.* (2011) 'Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells', *Biochemical Pharmacology*, 82(9), pp. 1090–1099. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.082>.

Kannan, K. *et al.* (2000) 'Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF- $\beta$  family', *FEBS Letters*, 470(1), pp. 77–82. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01291-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01291-6).

Kaplan, N.M. *et al.* (1985) 'Potassium supplementation in hypertensive patients with diuretic-induced hypokalemia.', *The New England journal of medicine*, 312(12), pp. 746–749. Available



at: <https://doi.org/10.1056/NEJM198503213121203>.

Kaufman, J.S. and Hamburger, R.J. (1985) 'Passive potassium transport in the proximal convoluted tubule', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 248(2), pp. F228–F232. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1985.248.2.F228>.

Kim, H. *et al.* (2020) 'Growth differentiation factor-15 as a biomarker for sarcopenia in aging humans and mice', *Experimental Gerontology*, 142, p. 111115. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111115>.

Kim, J. *et al.* (1999) 'Intercalated Cell Subtypes in Connecting Tubule and Cortical Collecting Duct of Rat and Mouse', *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.V1011>.

Kim, K.H. *et al.* (2018) 'Growth differentiation factor 15 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and related metabolic disorders in mice', *Scientific Reports*, 8(1), p. 6789. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25098-0>.

Kim, K.-K. *et al.* (2008) 'Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells', *Carcinogenesis*, 29(4), pp. 704–712. Available at: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn031>.

Kleyman, T.R., Carattino, M.D. and Hughey, R.P. (2009) 'ENaC at the Cutting Edge: Regulation of Epithelial Sodium Channels by Proteases', *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), pp. 20447–20451. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.R800083200>.

Knochel, J.P., Dotin, L.N. and Hamburger, R.J. (1972) 'Pathophysiology of Intense Physical Conditioning in a Hot Climate. I. MECHANISMS OF POTASSIUM DEPLETION', *Journal of Clinical Investigation*, 51(2), pp. 242–255. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI106809>.

Kurt, B. and Kurtz, A. (2015) 'Plasticity of renal endocrine function', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(6), pp. R455–R466. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00568.2013>.

Lajer, M. *et al.* (2010) 'Plasma Growth Differentiation Factor-15 Independently Predicts All-Cause and Cardiovascular Mortality As Well As Deterioration of Kidney Function in Type 1 Diabetic Patients With Nephropathy', *Diabetes Care*, 33(7), pp. 1567–1572. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc09-2174>.

Laurens, C. *et al.* (2020) 'Growth and differentiation factor 15 is secreted by skeletal muscle during exercise and promotes lipolysis in humans', *JCI Insight*, 5(6), p. e131870. Available at: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131870>.

Lawton, L.N. *et al.* (1997) 'Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta', *Gene*, 203(1), pp. 17–26. Available at:

[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00485-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00485-X).

Le, T.H. *et al.* (2013) ‘The Renin–Angiotensin System’, in *Seldin and Giebisch’s The Kidney*. Elsevier, pp. 427–450. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381462-3.00015-X>.

Levi, M. *et al.* (1991) ‘Chronic K depletion stimulates rat renal brush-border membrane Na-citrate cotransporter’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 261(5), pp. F767–F773. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1991.261.5.F767>.

Li, D., Zhang, H. and Zhong, Y. (2018) ‘Hepatic GDF15 is regulated by CHOP of the unfolded protein response and alleviates NAFLD progression in obese mice’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(3), pp. 388–394. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.096>.

Li, S. *et al.* (2018) ‘GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2’, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), p. 80. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0744-0>.

Li, Z. *et al.* (2005) ‘Identification, expression and functional characterization of the GRAL gene’, *Journal of Neurochemistry*, 95(2), pp. 361–376. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03372.x>.

Lindheimer, M.D. *et al.* (1987) ‘Potassium homeostasis in pregnancy.’, *The Journal of reproductive medicine*, 32(7), pp. 517–522.

Lingueglia, E. *et al.* (1994) ‘Different homologous subunits of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel are differently regulated by aldosterone.’, *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), pp. 13736–13739. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36706-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36706-6).

Liu, W. *et al.* (2009) ‘Mechanoregulation of BK channel activity in the mammalian cortical collecting duct: role of protein kinases A and C’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297(4), pp. F904–F915. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90685.2008>.

Loffing, J. *et al.* (2001) ‘Aldosterone induces rapid apical translocation of ENaC in early portion of renal collecting system: possible role of SGK’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 280(4), pp. F675–F682. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.4.F675>.

Luan, H.H. *et al.* (2019) ‘GDF15 Is an Inflammation-Induced Central Mediator of Tissue Tolerance’, *Cell*, 178(5), pp. 1231–1244.e11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.033>.

Lv, C. *et al.* (2022) ‘M1 Macrophages Enhance Survival and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma by Inducing GDF15-Mediated ErbB2 Phosphorylation’, *ACS Omega*, 7(13), pp.

- 11405–11414. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00571>.
- Machado, V. *et al.* (2016) ‘Growth/differentiation factor-15 deficiency compromises dopaminergic neuron survival and microglial response in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson’s disease’, *Neurobiology of Disease*, 88, pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.12.016>.
- Macia, L. *et al.* (2012) ‘Macrophage Inhibitory Cytokine 1 (MIC-1/GDF15) Decreases Food Intake, Body Weight and Improves Glucose Tolerance in Mice on Normal & Obesogenic Diets’, *PLoS ONE*. Edited by M.B. Aguila, 7(4), p. e34868. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034868>.
- Madsen, K.M., Verlander, J.W. and Tisher, C.C. (1988) ‘Relationship between structure and function in distal tubule and collecting duct’, *Journal of Electron Microscopy Technique*, 9(2), pp. 187–208. Available at: <https://doi.org/10.1002/jemt.1060090206>.
- Malnic, G., Klose, R.M. and Giebisch, G. (1964) ‘Micropuncture study of renal potassium excretion in the rat’, *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 206(4), pp. 674–686. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1964.206.4.674>.
- Malsure, S. *et al.* (2014) ‘Colon-Specific Deletion of Epithelial Sodium Channel Causes Sodium Loss and Aldosterone Resistance’, *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(7), pp. 1453–1464. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2013090936>.
- Marjono, A.B. *et al.* (2003) ‘Macrophage Inhibitory Cytokine-1 in Gestational Tissues and Maternal Serum in Normal and Pre-eclamptic Pregnancy’, *Placenta*, 24(1), pp. 100–106. Available at: <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0881>.
- Martin, R.S. *et al.* (1986) ‘Increased Secretion of Potassium in the Rectum of Humans With Chronic Renal Failure’, *American Journal of Kidney Diseases*, 8(2), pp. 105–110. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(86\)80120-2](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(86)80120-2).
- Massagué, J. (2008) ‘TGF $\beta$  in Cancer’, *Cell*, 134(2), pp. 215–230. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.001>.
- Matsuda, O. *et al.* (1988) ‘Primary Role of Hyperkalemia in the Acidosis of Hyporeninemic Hypoaldosteronism’, *Nephron*, 49(3), pp. 203–209. Available at: <https://doi.org/10.1159/000185056>.
- Mattu, A., Brady, W.J. and Robinson, D.A. (2000) ‘Electrocardiographic manifestations of hyperkalemia’, *The American Journal of Emergency Medicine*, 18(6), pp. 721–729. Available at: <https://doi.org/10.1053/ajem.2000.7344>.
- Mazagova, M. *et al.* (2013) ‘Genetic deletion of growth differentiation factor 15 augments renal damage in both type 1 and type 2 models of diabetes’, *American Journal of Physiology-Renal*

- Physiology*, 305(9), pp. F1249–F1264. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00387.2013>.
- McCormick, J.A. and Ellison, D.H. (2014) ‘Distal Convolute Tubule’, in R. Terjung (ed.) *Comprehensive Physiology*. 1st edn. Wiley, pp. 45–98. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c140002>.
- McCormick, J.A. and Ellison, D.H. (2018) ‘The Distal Convolute Tubule’.
- McDonough, A.A., Thompson, C.B. and Youn, J.H. (2002) ‘Skeletal muscle regulates extracellular potassium’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 282(6), pp. F967–F974. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00360.2001>.
- Meneton, P. *et al.* (1998) ‘Increased Sensitivity to K<sup>2</sup> Deprivation in Colonic H,K-ATPase-deficient Mice’, p. 7.
- Meneton, P., Loffing, J. and Warnock, D.G. (2004) ‘Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 287(4), pp. F593–F601. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00454.2003>.
- Mente, A. *et al.* (2014) ‘Association of Urinary Sodium and Potassium Excretion with Blood Pressure’, *New England Journal of Medicine*, 371(7), pp. 601–611. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311989>.
- Mernissi, G.E. and Doucet, A. (1983) ‘Short-term effects of aldosterone and dexamethasone on Na<sup>+</sup>K-ATPase along the rabbit nephron’, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 399(2), pp. 147–151. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00663911>.
- Mick, V.E. *et al.* (2001) ‘The  $\alpha$ -Subunit of the Epithelial Sodium Channel Is an Aldosterone-Induced Transcript in Mammalian Collecting Ducts, and This Transcriptional Response Is Mediated via Distinct *cis* -Elements in the 5'-Flanking Region of the Gene’, *Molecular Endocrinology*, 15(4), pp. 575–588. Available at: <https://doi.org/10.1210/mend.15.4.0620>.
- Mimeault, M. and Batra, S.K. (2010) ‘Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer’, *Journal of Cellular Physiology*, 224(3), pp. 626–635. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.22196>.
- Moeller, H.B. and Fenton, R.A. (2012) ‘Cell biology of vasopressin-regulated aquaporin-2 trafficking’, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 464(2), pp. 133–144. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1129-4>.
- Moranne, O. *et al.* (2009) ‘Timing of Onset of CKD-Related Metabolic Complications’, *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(1), pp. 164–171. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2008020159>.

- Morla, L. *et al.* (2016) 'The renal cortical collecting duct: a secreting epithelium?: H/K-ATPase-mediated sodium secretion in the mouse collecting duct', *The Journal of Physiology*, 594(20), pp. 5991–6008. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP272877>.
- Morla, L. *et al.* (2020) 'A noninvasive method to study the evolution of extracellular fluid volume in mice using time-domain nuclear magnetic resonance', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 319(1), pp. F115–F124. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00377.2019>.
- Mujais, S.K. *et al.* (1984) 'Regulation of renal Na-K-ATPase in the rat. Role of the natural mineralo- and glucocorticoid hormones.', *Journal of Clinical Investigation*, 73(1), pp. 13–19. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI111183>.
- Mullican, S.E. *et al.* (2017) 'GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates', *Nature Medicine*, 23(10), pp. 1150–1157. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4392>.
- Mullican, S.E. and Rangwala, S.M. (2018) 'Uniting GDF15 and GFRAL: Therapeutic Opportunities in Obesity and Beyond', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(8), pp. 560–570. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.002>.
- Muto, S. (2001) 'Potassium Transport in the Mammalian Collecting Duct', *Physiological Reviews*, 81(1), pp. 85–116. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.85>.
- Nagalakshmi, V.K. and Yu, J. (2015) 'The ureteric bud epithelium: Morphogenesis and roles in metanephric kidney patterning', *Molecular Reproduction and Development*, 82(3), pp. 151–166. Available at: <https://doi.org/10.1002/mrd.22462>.
- Nair, V. *et al.* (2017) 'Growth Differentiation Factor–15 and Risk of CKD Progression', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(7), pp. 2233–2240. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2016080919>.
- Najjar, F. *et al.* (2005) 'Dietary K<sup>+</sup> regulates apical membrane expression of maxi-K channels in rabbit cortical collecting duct', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(4), pp. F922–F932. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00057.2005>.
- Náray-Fejes-Tóth, A. *et al.* (1999) 'sgk Is an Aldosterone-induced Kinase in the Renal Collecting Duct', *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), pp. 16973–16978. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16973>.
- O'Donnell, M. *et al.* (2014) 'Urinary Sodium and Potassium Excretion, Mortality, and Cardiovascular Events', *New England Journal of Medicine*, 371(7), pp. 612–623. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311889>.
- Okazaki, R. *et al.* (2006) 'Ionizing Radiation Enhances the Expression of the Nonsteroidal Anti-

inflammatory Drug-Activated Gene ( *NAG1* ) by Increasing the Expression of TP53 in Human Colon Cancer Cells’, *Radiation Research*, 165(2), pp. 125–130. Available at: <https://doi.org/10.1667/RR3492.1>.

Okusa, M.D. *et al.* (1990) ‘Luminal calcium regulates potassium transport by the renal distal tubule’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 258(2), pp. F423–F428. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.258.2.F423>.

Ost, M. *et al.* (2016) ‘Regulation of myokine expression: Role of exercise and cellular stress’, *Free Radical Biology and Medicine*, 98, pp. 78–89. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.018>.

Ost, M. *et al.* (2020) ‘Muscle-derived GDF15 drives diurnal anorexia and systemic metabolic remodeling during mitochondrial stress’, *EMBO reports*, 21(3). Available at: <https://doi.org/10.15252/embr.201948804>.

Palmer, B.F. (2015) ‘Regulation of Potassium Homeostasis’, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(6), pp. 1050–1060. Available at: <https://doi.org/10.2215/CJN.08580813>.

Palmer, B.F. and Alpern, R.J. (1998) ‘Liddle’s syndrome’, *American Journal of Medicine*, 1 March, p. 301.

Palmer, B.F. and Clegg, D.J. (2022) ‘Extrarenal Effects of Aldosterone on Potassium Homeostasis’, *Kidney360*, 3(3), pp. 561–568. Available at: <https://doi.org/10.34067/KID.0006762021>.

Palmer, L.G. and Frindt, G. (1999) ‘Regulation of apical K channels in rat cortical collecting tubule during changes in dietary K intake’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(5), pp. F805–F812. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.5.F805>.

Paltiel, O. *et al.* (2001) ‘Management of Severe Hypokalemia in Hospitalized Patients: A Study of Quality of Care Based on Computerized Databases’, *Archives of Internal Medicine*, 161(8), p. 1089. Available at: <https://doi.org/10.1001/archinte.161.8.1089>.

Paragas, N. *et al.* (2014) ‘ $\alpha$ -Intercalated cells defend the urinary system from bacterial infection’, *Journal of Clinical Investigation*, 124(7), pp. 2963–2976. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI71630>.

Paralkar, V.M. *et al.* (1998) ‘Cloning and Characterization of a Novel Member of the Transforming Growth Factor- $\beta$ /Bone Morphogenetic Protein Family’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), pp. 13760–13767. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13760>.

Parisi, A. *et al.* (2002) ‘Complex ventricular arrhythmia induced by overuse of potassium supplementation in a young male football player. Case report.’, *The Journal of sports medicine*

and physical fitness, 42(2), pp. 214–216.

Park, E.-Y. (2012) ‘Proposed mechanism in the change of cellular composition in the outer medullary collecting duct during potassium homeostasis’, *Histology and Histopathology*, (27), pp. 1559–1577. Available at: <https://doi.org/10.14670/HH-27.1559>.

Patel, A.B., Chao, J. and Palmer, L.G. (2012) ‘Tissue kallikrein activation of the epithelial Na channel’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 303(4), pp. F540–F550. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00133.2012>.

Patel, S. *et al.* (2019) ‘GDF15 Provides an Endocrine Signal of Nutritional Stress in Mice and Humans’, *Cell Metabolism*, 29(3), pp. 707–718.e8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.016>.

Pearce, D. *et al.* (2015) ‘Collecting Duct Principal Cell Transport Processes and Their Regulation’, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(1), pp. 135–146. Available at: <https://doi.org/10.2215/CJN.05760513>.

Perez-Gomez, M.V. *et al.* (2021) ‘Urinary Growth Differentiation Factor-15 (GDF15) levels as a biomarker of adverse outcomes and biopsy findings in chronic kidney disease’, *Journal of Nephrology*, 34(6), pp. 1819–1832. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40620-021-01020-2>.

Peti-Peterdi, J. and Harris, R.C. (2010) ‘Macula Densa Sensing and Signaling Mechanisms of Renin Release: Figure 1.’, *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(7), pp. 1093–1096. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2009070759>.

Petty, K.J., Kokko, J.P. and Marver, D. (1981) ‘Secondary effect of aldosterone on Na-KATPase activity in the rabbit cortical collecting tubule.’, *Journal of Clinical Investigation*, 68(6), pp. 1514–1521. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI110405>.

Rajendran, V.M. and Sandle, G.I. (2018) ‘Colonic Potassium Absorption and Secretion in Health and Disease’, in R. Terjung (ed.) *Comprehensive Physiology*. 1st edn. Wiley, pp. 1513–1536. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c170030>.

Rajkumar, V. and Waseem, M. (2022) ‘Hypoaldosteronism’, *StatPearls* [Preprint]. Available at:

<http://proxy.insermbiblio.inist.fr/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid&db=cmedm&AN=32310452&lang=fr&site=eds-live>.

Ray, P.E. *et al.* (2001) ‘Chronic potassium depletion induces renal injury, salt sensitivity, and hypertension in young rats’, *Kidney International*, 59(5), pp. 1850–1858.

Rechkemmer, G. and Halm, D.R. (1989) ‘Aldosterone stimulates K secretion across mammalian colon independent of Na absorption.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), pp. 397–401. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.397>.

- Rochette, L. *et al.* (2020) 'Insights Into Mechanisms of GDF15 and Receptor GFRAL: Therapeutic Targets', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(12), pp. 939–951. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.10.004>.
- Rosenberg, J. *et al.* (2005) 'Combination Therapy with Metolazone and Loop Diuretics in Outpatients with Refractory Heart Failure: An Observational Study and Review of the Literature', *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 19(4), pp. 301–306. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10557-005-3350-2>.
- Roy, A., Al-bataineh, M.M. and Pastor-Soler, N.M. (2015) 'Collecting Duct Intercalated Cell Function and Regulation', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(2), pp. 305–324. Available at: <https://doi.org/10.2215/CJN.08880914>.
- Royaux, I.E. *et al.* (2000) 'Pendrin, the Protein Encoded by the Pendred Syndrome Gene (PDS), Is an Apical Porter of Iodide in the Thyroid and Is Regulated by Thyroglobulin in FRTL-5 Cells', 141(2), p. 7.
- Salhi, A. *et al.* (2013) 'A link between fertility and K<sup>+</sup> homeostasis: role of the renal H,K-ATPase type 2', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 465(8), pp. 1149–1158. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1252-x>.
- Sargent, A.I. and Deppe, S.A. (1994) 'Octreotide-Induced Hyperkalemia', 14(4), p. 5.
- Saritas, T. *et al.* (2019) 'Optical Clearing in the Kidney Reveals Potassium-Mediated Tubule Remodeling'.
- Schindowski, K. *et al.* (2011) 'Regulation of GDF-15, a distant TGF- $\beta$  superfamily member, in a mouse model of cerebral ischemia', *Cell and Tissue Research*, 343(2), pp. 399–409. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1090-5>.
- Schnaper, H.W. *et al.* (1989) 'Potassium Restoration in Hypertensive Patients Made Hypokalemic by Hydrochlorothiazide', *Archives of Internal Medicine*, 149(12), pp. 2677–2681.
- Schober, A. *et al.* (2001) 'Expression of growth differentiation factor-15/ macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain: GDF-15/MIC-1 Expression in the Rat Brain', *Journal of Comparative Neurology*, 439(1), pp. 32–45. Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.1333>.
- Schwartz, W.B. and Relman, A.S. (1967) 'Effects of Electrolyte Disorders on Renal Structure and Function', *New England Journal of Medicine*, 276(8), pp. 452–458.
- Scudieri, P. *et al.* (2018) 'Increased expression of ATP12A proton pump in cystic fibrosis airways', *JCI Insight*, 3(20), p. e123616. Available at: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123616>.



- Sebastian, A. *et al.* (2002) 'Estimation of the net acid load of the diet of ancestral preagricultural Homo sapiens and their hominid ancestors', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(6), pp. 1308–1316. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.6.1308>.
- Sever, M.S. and Vanholder, R. (2011) 'Management of crush syndrome casualties after disasters.', *Rambam Maimonides medical journal*, 2(2), p. e0039. Available at: <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10039>.
- Singh, S.K. *et al.* (2012) 'Aldosterone induces active K<sup>+</sup> secretion by enhancing mucosal expression of Kcnn4c and Kcnma1 channels in rat distal colon', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 302(9), pp. C1353–C1360. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00216.2011>.
- Smith, H.M. *et al.* (2008) 'Cardiac Arrests Associated with Hyperkalemia During Red Blood Cell Transfusion: A Case Series', *Anesthesia & Analgesia*, 106(4), pp. 1062–1069. Available at: <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e318164f03d>.
- Snyder, P.M., Olson, D.R. and Thomas, B.C. (2002) 'Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase Modulates Nedd4-2-mediated Inhibition of the Epithelial Na<sup>+</sup>Channel', *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), pp. 5–8. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C100623200>.
- Sørensen, M.V. *et al.* (2008) 'Aldosterone increases K<sub>ca</sub> 1.1 (BK) channel-mediated colonic K<sup>+</sup> secretion: Aldosterone up-regulates colonic BK channel', *The Journal of Physiology*, 586(17), pp. 4251–4264. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.156968>.
- Sorensen, M.V. *et al.* (2010) 'Colonic potassium handling', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 459(5), pp. 645–656. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0781-9>.
- Soussi, T. (2006) 'The p53 Tumor Suppressor Gene: From Molecular Biology to Clinical Investigation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 910(1), pp. 121–139. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06705.x>.
- Stern, L., Backman, K.A. and Hayslett, J.P. (1985) 'Effect of cortical-medullary gradient for ammonia on urinary excretion of ammonia', *Kidney International*, 27(4), pp. 652–661. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.1985.60>.
- Stokes, J.B. (1982) 'Consequences of Potassium Recycling in the Renal Medulla', *The American Society for Clinical Investigation*, 70, p. 11.
- Strelau, J. *et al.* (2000) 'Growth/Differentiation Factor-15/Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Is a Novel Trophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons *In Vivo*', *The Journal of Neuroscience*, 20(23), pp. 8597–8603. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08597.2000>.
- Strelau, J. *et al.* (2009) 'Progressive Postnatal Motoneuron Loss in Mice Lacking GDF-15',

*Journal of Neuroscience*, 29(43), pp. 13640–13648. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1133-09.2009>.

Subramaniam, S., Strelau, J. and Unsicker, K. (2003) ‘Growth Differentiation Factor-15 Prevents Low Potassium-induced Cell Death of Cerebellar Granule Neurons by Differential Regulation of Akt and ERK Pathways’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp. 8904–8912. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M210037200>.

Subramanya, A.R. *et al.* (2006) ‘WNK kinases regulate sodium chloride and potassium transport by the aldosterone-sensitive distal nephron’, *Kidney International*, 70(4), pp. 630–634. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001634>.

Taal, M.W., Brenner, B.M. and Rector, F.C. (eds) (2012) *Brenner & Rector’s the kidney*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders.

Tabibzadeh, N. and Crambert, G. (2022) ‘Mechanistic insights into the primary and secondary alterations of renal ion and water transport in the distal nephron’, *Journal of Internal Medicine*, p. joim.13552. Available at: <https://doi.org/10.1111/joim.13552>.

Tang, H. *et al.* (2019) ‘mTORC1 underlies age-related muscle fiber damage and loss by inducing oxidative stress and catabolism’, *Aging Cell*, 18(3), p. e12943. Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12943>.

Tang, N.L.S. *et al.* (1999) ‘Severe hypokalemic myopathy in Gitelman’s syndrome’, *Muscle & Nerve*, 22(4), pp. 545–547. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199904\)22:4<545::AID-MUS25>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199904)22:4<545::AID-MUS25>3.0.CO;2-W).

Tannen, R.L., Wedell, E. and Moore, R. (1973) ‘Renal Adaptation to a High Potassium Intake’, *Journal of Clinical Investigation*, 52(9), pp. 2089–2101. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI107394>.

Terker, A.S. *et al.* (2015) ‘Potassium Modulates Electrolyte Balance and Blood Pressure through Effects on Distal Cell Voltage and Chloride’, *Cell Metabolism*, 21(1), pp. 39–50. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.006>.

Tsai, V.W. *et al.* (2018) ‘Treatment with the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1/GDF15 reduces the adiposity and corrects the metabolic dysfunction of mice with diet-induced obesity’, *International Journal of Obesity*, 42(3), pp. 561–571. Available at: <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.258>.

Tsai, V.W.-W. *et al.* (2013) ‘TGF- $\beta$  Superfamily Cytokine MIC-1/GDF15 Is a Physiological Appetite and Body Weight Regulator’, *PLoS ONE*. Edited by C. Morrison, 8(2), p. e55174. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055174>.

Tsai, V.W.-W. *et al.* (2014) ‘The Anorectic Actions of the TGF $\beta$  Cytokine MIC-1/GDF15

Require an Intact Brainstem Area Postrema and Nucleus of the Solitary Tract’, *PLoS ONE*. Edited by M. Covasa, 9(6), p. e100370. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100370>.

Tsai, V.W.W. *et al.* (2018) ‘The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases’, *Cell Metabolism*, 28(3), pp. 353–368. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.018>.

Tsui, K.-H. *et al.* (2015) ‘Growth differentiation factor-15: a p53- and demethylation-upregulating gene represses cell proliferation, invasion and tumorigenesis in bladder carcinoma cells’, *Scientific Reports*, 5(1), p. 12870. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep12870>.

Tziviskou, E. *et al.* (2003) ‘Prevalence and pathogenesis of hypokalemia in patients on chronic peritoneal dialysis: One center’s experience and review of the literature’, *International Urology and Nephrology*, 35(3), pp. 429–434. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:UROL.0000022867.93739.03>.

Van Huyen, J.P.D. *et al.* (2008) ‘GDF15 Triggers Homeostatic Proliferation of Acid-Secreting Collecting Duct Cells’, *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(10), pp. 1965–1974. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2007070781>.

Verlander, J.W. *et al.* (2011) ‘Angiotensin II acts through the angiotensin 1a receptor to upregulate pendrin’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 301(6), pp. F1314–F1325. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00114.2011>.

Wahr, J.A. *et al.* (1999) ‘Preoperative Serum Potassium Levels and Perioperative Outcomes in Cardiac Surgery Patients’, p. 8.

Wall, S.M. (2016) ‘The role of pendrin in blood pressure regulation’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 310(3), pp. F193–F203. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00400.2015>.

Walter, C. *et al.* (2016) ‘H,K-ATPase type 2 contributes to salt-sensitive hypertension induced by K<sup>+</sup> restriction’, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 468(10), pp. 1673–1683. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1872-z>.

Wang, B. *et al.* (2021) ‘The Role of the Transcription Factor EGR1 in Cancer’, *Frontiers in Oncology*, 11, p. 642547. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.642547>.

Wang, W.-H. (2017) ‘Basolateral Kir4.1 activity in the distal convoluted tubule regulates K secretion by determining NCC activity’.

Wang, W.-H. and Giebisch, G. (2009) ‘Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct’, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 458(1), pp. 157–168. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0593-3>.

- Waring, W.S. *et al.* (2008) 'Acute Acetaminophen Overdose Is Associated with Dose-Dependent Hypokalaemia: A Prospective Study of 331 Patients', *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 102(3), pp. 325–328. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00176.x>.
- Weir, M.R. and Rolfe, M. (2010) 'Potassium Homeostasis and Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(3), pp. 531–548. Available at: <https://doi.org/10.2215/CJN.07821109>.
- West, C.A. *et al.* (2018) 'Renal and colonic potassium transporters in the pregnant rat', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 314(2), pp. F251–F259. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00288.2017>.
- White, P.C. (2001) '11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Its Role in the Syndrome of Apparent Mineralocorticoid Excess', *The American Journal of the Medical Sciences*, 322(6), pp. 308–315. Available at: <https://doi.org/10.1097/00000441-200112000-00003>.
- Wiklund, F.E. *et al.* (2010) 'Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a new marker of all-cause mortality: Serum MIC-1/GDF15 and mortality risk', *Aging Cell*, 9(6), pp. 1057–1064. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00629.x>.
- Wischhusen, J., Melero, I. and Fridman, W.H. (2020) 'Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint', *Frontiers in Immunology*, 11, p. 951. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00951>.
- Wittner, M. *et al.* (1991) 'How Do Loop Diuretics Act?':, *Drugs*, 41(Supplement 3), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.2165/00003495-199100413-00003>.
- Wollert, K.C., Kempf, T. and Wallentin, L. (2017) 'Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease', *Clinical Chemistry*, 63(1), pp. 140–151. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.255174>.
- Xiong, Y. *et al.* (2017) 'Long-acting MIC-1/GDF15 molecules to treat obesity: Evidence from mice to monkeys', *Science Translational Medicine*, 9(412), p. eaan8732. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8732>.
- Yang, L. *et al.* (2017) 'GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand', *Nature Medicine*, 23(10), pp. 1158–1166. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4394>.
- Yang, L., Frindt, G. and Palmer, L.G. (2010) 'Magnesium Modulates ROMK Channel-Mediated Potassium Secretion', *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(12), pp. 2109–2116. Available at: <https://doi.org/10.1681/ASN.2010060617>.
- Youn, J.H. (2013) 'Gut Sensing of Potassium Intake and its Role in Potassium Homeostasis',

*Seminars in Nephrology*, 33(3), pp. 248–256. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2013.04.005>.

Youn, J.H. and McDonough, A.A. (2009) ‘Recent Advances in Understanding Integrative Control of Potassium Homeostasis’, *Annual Review of Physiology*, 71(1), pp. 381–401. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163241>.

Yu, S.P. (2003) ‘Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis’, *Progress in Neurobiology*, 70(4), pp. 363–386. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00090-X).

Zhao, T. *et al.* (2022) ‘Mechanism of sensitivity to cisplatin, docetaxel, and 5-fluorouracil chemoagents and potential erbB2 alternatives in oral cancer with growth differentiation factor 15 overexpression’, *Cancer Science*, 113(2), pp. 478–488. Available at: <https://doi.org/10.1111/cas.15218>.

Zhuo, J.L. and Li, X.C. (2013) ‘Proximal Nephron’, in R. Terjung (ed.) *Comprehensive Physiology*. 1st edn. Wiley, pp. 1079–1123. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c110061>.

## RÉSUMÉ

Le potassium ( $K^+$ ) est essentiel à de nombreuses fonctions physiologiques comme l'activité cardiaque et neuromusculaire. Afin de maintenir une kaliémie constante, notre organisme possède deux systèmes de régulation appelés balance interne et balance externe. L'acteur majeur de la balance interne est le muscle, qui est capable de stocker ou de libérer du  $K^+$  selon les besoins. La balance externe a pour acteur majeur le rein qui est capable de réabsorber ou excréter du  $K^+$  selon les apports journaliers.

Nous nous sommes intéressés à deux situations impliquant la mise en place de mécanismes pour le maintien d'une kaliémie stable : la restriction potassique et la gestation. Dans ces deux cas, une partie de la rétention de  $K^+$  est liée à la surexpression et à l'activation, par la progestérone, de la  $H^+,K^+$ -ATPase de type 2 (HKA2) exprimée dans les cellules intercalaires de type A (ICA).

Dans le cadre de la première étude, nous avons démontré que le facteur de croissance GDF15 est essentiel à l'adaptation rénale à une restriction potassique. Lors d'un régime faible en  $K^+$ , l'absence de GDF15 induit une fuite de  $K^+$  dans les urines expliquée par une absence d'augmentation du nombre d'ICA, provoquant une hypokaliémie. L'augmentation du nombre d'ICA induit par GDF15 est médiée par le récepteur ErbB2. De plus, l'absence de GDF15 perturbe la réponse musculaire à la restriction potassique.

Dans le cadre de la seconde étude, nous avons démontré que les souris HKA2<sup>-/-</sup> gestantes maintiennent une valeur de kaliémie stable, grâce à la réduction de leur volume extracellulaire passant par une diminution de la réabsorption de  $Na^+$  au niveau du néphron distal, associée à une hypotension.

Ainsi, nous avons identifié un facteur, GDF15, qui permet la réponse rénale à une restriction potassique et démontré que la préservation de la kaliémie peut se faire au détriment du volume extracellulaire et de la pression artérielle.

**Mots clés :** Homéostasie du potassium, cellules intercalaires de type A, GDF15, HKA2.

## ABSTRACT

Potassium ( $K^+$ ) is essential for many physiological functions such as cardiac and neuromuscular activity. In order to maintain a constant plasma  $K^+$  value, our body has two regulatory systems called internal balance and external balance. The main actor of the internal balance is the muscle, which is able to store or release  $K^+$ . The main actor of the external balance is the kidney, which is able to reabsorb or excrete  $K^+$  according to the daily intake.

We focused on two situations involving mechanisms for maintaining a normal plasma  $K^+$  value:  $K^+$  restriction and gestation. In both cases, some of the  $K^+$  retention is mediated by the upregulation and the progesterone-dependent activation of the type 2  $H^+,K^+$ -ATPase (HKA2) expressed in the Type A intercalated cells (ICA).

In the first study, we demonstrated that the growth factor GDF15 is essential for renal adaptation to  $K^+$  restriction. During a low  $K^+$  diet, the absence of GDF15 induces a leak of  $K^+$  in the urine explained by an altered increase of ICA, causing hypokalemia. The GDF15-dependent increase of ICA is mediated by the ErbB2 receptor. In addition, the absence of GDF15 disrupts the muscle response to  $K^+$  restriction.

In the second study, we showed that pregnant HKA2<sup>-/-</sup> mice maintain a stable plasma  $K^+$  value, due to the reduction of their extracellular volume through a decrease in  $Na^+$  reabsorption in the distal nephron, associated with hypotension.

Thus, we identified a factor, GDF15, which allows the renal response to  $K^+$  restriction and demonstrated that preserving a normal plasma  $K^+$  value can be done at the expense of extracellular volume and blood pressure.

**Keywords:** Potassium homeostasis, type A intercalated cells, GDF15, HKA2.