



HAL
open science

Rôle des microARNs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du Récepteur Minéralocorticoïde en physiologie et physiopathologie

Thi An Vu

► **To cite this version:**

Thi An Vu. Rôle des microARNs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du Récepteur Minéralocorticoïde en physiologie et physiopathologie. Endocrinologie et métabolisme. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL058 . tel-04230484

HAL Id: tel-04230484

<https://theses.hal.science/tel-04230484>

Submitted on 6 Oct 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.

Rôle des microARNs dans le Contrôle
Post-transcriptionnel de l'Expression
Rénale du Récepteur Minéralocorticoïde
en Physiologie et Physiopathologie

*Role of microRNAs in the Post-transcriptional
Control of Renal Mineralocorticoid Receptor
Expression in Physiology and Pathophysiology*

Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°568 Signalisations et Réseaux intégratifs en Biologie
(Biosigne)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Physiologie et Physiopathologie
Endocriniennes, 94276, Le Kremlin Bicêtre, France
Réfèrent : Faculté de Médecine

**Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre,
le 22/09/2021, par**

Thi An VU

Composition du Jury

Monsieur le Pr Mohammed TAOUIS Professeur, Université Paris-Saclay, CNRS UMR 9197	Président
Madame le Dr Isabelle DUROUX-RICHARD IRHC, HDR, Université de Montpellier, Inserm U1183	Rapporteuse/Examinatrice
Monsieur le Dr Laurent KAPPELER CRCN, HDR, Sorbonne Université, Inserm U938	Rapporteur/Examinateur
Madame le Pr Hélène FRANCOIS-PRADIER PUPH, Sorbonne Université, Inserm UMR_S1155	Examinatrice
Madame le Dr Nadia CHERRADI DR2, HDR, Université de Grenoble, Inserm U1292	Examinatrice

Direction de la thèse

Monsieur le Dr Say VIENGCHAREUN IRHC, HDR, Université Paris-Saclay, Inserm U1185	Directeur de thèse
--	--------------------

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus vifs remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de Thèse :

- Au Pr Mohammed Taouis, qui a assuré le rôle de Tuteur Interne de l'Ecole Doctorale dans le Comité de Suivi de Thèse et qui me fait aujourd'hui l'honneur de présider ce jury
- Au Dr Isabelle Richard-Duroux et au Dr Laurent Kappeler qui ont accepté d'être Rapporteur(e) de mon mémoire de Thèse. Je vous remercie particulièrement d'avoir eu la gentillesse et la patience de relire attentivement mon manuscrit
- Au Pr Hélène François-Pradier, qui a accepté de siéger comme Examinatrice dans ce jury et qui pourra enrichir la discussion grâce à son expertise clinique en néphrologie.
- Au Dr Nadia Cherradi, qui a assuré le rôle d'Experte Externe à l'Ecole Doctorale dans le Comité de Suivi de Thèse et qui a accepté aujourd'hui d'être Examinatrice dans ce jury de Thèse. Je vous remercie énormément pour tous les conseils et les encouragements que vous m'avez adressés.

Je voudrais ensuite remercier toutes les personnes qui m'ont aidée à mener ce travail de Thèse jusqu'à son terme.

Je voudrais remercier en premier lieu mon Directeur de Thèse :

Cher Say, je te remercie du plus profond de mon cœur de m'avoir accueillie avec Marc dans cette équipe formidable et de m'avoir suivie tout au long de ces travaux de recherche depuis mon stage de Master 1 et de Master 2 jusqu'à la Thèse de Sciences. Merci de m'avoir accordé ta confiance pour mener à bien ce projet avec une grande autonomie. J'ai eu l'occasion de développer mes compétences non seulement dans la recherche mais aussi dans l'encadrement des étudiants. Cela me sera très utile pour poursuivre une carrière hospitalo-universitaire. Merci de m'avoir accompagnée avec la même détermination jusqu'à la fin de cette thèse. Je te remercie enfin pour tes encouragements et ton soutien tout au long de ce long chemin.

J'adresse également ma profonde reconnaissance au Dr Marc Lombès, mon second encadrant, qui m'a accompagnée dès les premiers pas sur le chemin de la recherche scientifique, et qui m'a transmis le savoir et la passion de la recherche. Nos nombreuses discussions m'ont enrichie et m'ont beaucoup aidée dans l'orientation de ma thèse :

Cher Marc, je te remercie énormément pour ces années précieuses de recherche à tes côtés. J'ai grandi vraiment dans la réflexion et la démarche scientifique. Merci à toi pour ta grande disponibilité, ta

gentillesse, ton humour. Merci d'avoir relu ce manuscrit de thèse et donné tes appréciations ainsi que tes remarques constructives qui m'ont permis d'avancer chaque jour.... Mille mercis à toi.

Je voudrais tout particulièrement remercier le Dr Laetitia Martinerie, « mon idole », « mon médecin-chercheuse-enseignante » préférée, qui m'a permis de valoriser une partie de mon travail de Thèse avec le projet PERIMRE, qui est vraiment intéressant :

Chère Laetitia, je te remercie de m'avoir transmis ton enthousiasme, tes pensées positives et l'esprit d'équipe. Merci à toi d'avoir relu le chapitre concernant le projet PERIMIRE.

J'exprime aussi mes sincères remerciements au Pr Peter Kamenický, Directeur actuel de notre unité pour son sens critique, ses précieux conseils et ses encouragements, notamment durant ma quatrième année de Thèse.

Je tiens par ailleurs à remercier les collaborateurs avec qui j'ai eu le plaisir et le privilège de travailler :

- le Pr Pierre-Jean Saulnier et le Pr Samy Hadjadj du Centre d'Investigation Clinique (CIC) de Poitiers, même si je n'aborde pas dans cette Thèse, les travaux que j'ai menés sur le rôle des miARNs circulants et/ou urinaires dans la néphropathie diabétique. Cette collaboration a permis d'enrichir notre projet
- le Dr Gilles Crambert et le Dr Lydie Cheval du Centre de Recherche des Cordeliers qui nous ont aidés à microdisséquer des tubules rénaux et qui ont enrichi nos discussions
- le Dr Anne Blanchard qui nous a conseillés et aidés dans les expériences de physiologie rénale
- le Dr Yannick Marie de la Plateforme de Genotypage Séquençage (iGenSeq), de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM), qui nous a aidés à réaliser le *miRNA-Sequencing*
- le Dr Sylvie Fabrega de la Plateforme Vecteurs Viraux et Transfert de Gènes de la Structure Fédérative de Recherche Necker, qui nous a aidés à générer les particules lentivirales surexprimant le miR-324-5p

Je remercie l'Ecole Doctorale qui m'a allouée une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et d'Innovation, me permettant de financer ces 4 années de Thèse de Sciences. Je remercie également la Société Française de Néphrologie, Dialyse et Transplantation qui m'a financée pour que je puisse réaliser mon projet de Master 2 dans les meilleures conditions.

Je voudrais remercier également le Pr Anne Guiochon-Mantel, responsable du Master 2 Biologie santé, spécialité Endocrinologie et Métabolisme, qui m'a orientée et m'a soutenue.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres de l'Unité Inserm U1185 pour leur soutien et la chaleur familiale qui a régné au laboratoire pendant ces 5 dernières années :

- Merci à Ingrid Lema pour son accompagnement durant mon Master 1 et au début de mon Master 2. Merci pour les moments de rigolade. J'espère que mes mille questions ne t'ont pas trop embêtée
- Merci à Elena, ma meilleure amie que j'ai eu la chance de rencontrer au labo, et qui m'a accompagnée par l'esprit durant ces deux dernières années et là encore...
- Merci à Vilayvane, Laura et Imène, que j'ai pu encadrer à la paillasse avec plaisir au cours de leur passage au laboratoire et qui ont contribué également à la réalisation de ce beau travail. Ma chère Vilayvane, je n'oublierais pas tes questions quotidiennes difficiles que tu me posais et ta bonne humeur. Merci Laura pour tes histoires cliniques au quotidien qui ont animé les séances d'extraction d'ARN entre nous trois AnAn-Lolo-Coco au coin du labo. Merci ma chère Imène pour nos bavardages entre filles dans le bureau et ton aide durant la fin de Thèse.
- Merci à notre adorable Françoise pour sa gentillesse, son écoute, sa disponibilité inédite au labo.
- Merci à ma belle Julie pour sa gentillesse et son soutien tout au long de ces trois dernières années. Attention, on a encore une « séance de massage » à faire avant le mois d'octobre.
- Un grand merci à Margaux qui est toujours de mon côté et qui m'a transmis l'énergie pour cette dernière année de Thèse.
- Merci à Stéphanie, Damien, Jérôme Fagart, mes voisins de bureau durant ces années, pour leurs précieux conseils dans les premières années de ma Thèse.
- Merci à « Larby », le roi de l'imagerie, pour ses renseignements, son enthousiasme débordant, ses discussions riches sur le plan professionnel et familial.
- Merci également à Nadine pour sa bienveillance quand j'ai participé au Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, ainsi que son soutien au début de ma Thèse. Je suis d'accord avec toi pour dire que les personnes nées en juillet ont plein de talents (LOL).
- Merci à Isabelle pour son soutien dans la dernière ligne droite, et ses petites astuces pour s'occuper d'un enfant.
- Merci à Jérôme Bouligand, la seule personne qui passe toujours dans notre bureau juste pour nous dire « bonjour » avec gentillesse et bonne humeur.
- Merci à Natty pour ses échanges précieux sur les manips, à Tiphaine pour ses conseils pour les expériences avec les souris et à Meriem pour ses encouragements qu'elle me donne chaque fois qu'elle me croise.
- Merci à tous les étudiants en Thèse qui ont partagé du temps très agréable avec moi durant ces 5 dernières années. Merci à Fanny, ma co-fan de bubble tea, pour les déjeuners remplis de sourires. (Gros bisous à mon petit prince Henri aussi). Merci à Laurence, Géraldine, Mirella pour toutes les histoires pleines de bonne humeur durant la Thèse de Sciences, de médecine et la vie quotidienne ; Merci à Simon pour les moments de partage et les soucis de crèche et/ou de nounou ; Merci à Patrick, Mohsen, Hui, Valérie, Charlotte, pour avoir partagé des moments heureux au labo au cours

de nos Thèses respectives. Un grand merci à Florian pour son accueil dès le premier jour au laboratoire et ses encouragements durant la thèse.

- De même, merci à tous les autres étudiants en Master qui ont partagé du temps au labo avec moi, avec une pensée toute spéciale pour mes camarades de promo : merci à Clémence, Laura Bessiène, Geoffrey, pour nos échanges pleins de bonne humeur pendant les cours à la fac, au labo, ou pendant nos sorties et tout particulièrement à Poitiers ; Merci à Sophie, Nelly, et surtout à Vianney pour les bons souvenirs pendant mon stage de M1 ; merci aussi à Loïc, Fabien, Lucie, Annabelle, Camille pour ces belles rencontres, et surtout merci à Fabien, qui m'a secourue lorsque je suis tombée dans les pommes ; Elodie, Alexandre, Apolline... je suis ravie de vous avoir rencontrés, d'avoir bavardé avec ce trinôme sur les problèmes de souris ou sur la médecine dans tous les coins du labo ; à Laura Atger, Coline, Salomé, Océana, ma team Cuvée Covid 2020 pleine de caractère, merci pour les échanges sur les bébés trop mignons et au top ; merci à la « nouvelle team Inserm U1185 2021 » Yasmine, Inès, Margaux, Imène pour les goûtés sucrés à 16 h, les commandes « familiales » chez Frichti, et pour toutes les anecdotes.
- Merci à Stéphane et Axel, Franck pour leur aide à l'animalerie.

Enfin, je tiens à remercier mes proches :

- Merci à ma chère famille au Vietnam, qui me soutient depuis toutes ces années malgré la distance ou le décalage horaire. Un grand merci à mon adorable mère, qui a toujours eu confiance en moi, en mes choix, et qui reconnaît très rapidement ma tristesse ou les moments de démotivation et qui me fait alors rire. Mille mercis à mes formidables beaux-parents pour leur soutien de toujours, leur persévérance et pour leur transmission de leur passion pour le travail.
- Un grand merci à nos parrains M & Mme Do, Anne-Elisabeth et Philippe pour leur soutien persistant, leurs conseils précieux durant les moments difficiles.
- Un immense merci à mes deux amours : mon petit prince Alex, qui est né et a grandi en même temps que ma Thèse de Sciences, et qui me donne chaque jour de la joie. A Loc, mon ami intime dans la vie, merci d'avoir été à mes côtés pour m'épauler et m'encourager tout au long de cette route.
- Un merci de tout cœur à mes meilleurs amis, Claire, Christophe, Tom, Lou, Michel, Colette, Margaux, Benjamin et à mes formidables colocs qui m'ont offert une seconde famille heureuse en France. Grâce à cette merveilleuse famille et à leur soutien indéfectible, j'ai progressé sur le plan personnel et professionnel.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	12
AVANT-PROPOS.....	14
INTRODUCTION	1
1. Physiologie de la réabsorption de sodium	1
1.1. Anatomie des reins et structure des néphrons.....	1
1.2. Le gradient cortico-papillaire	4
1.3. Réabsorption de sodium dans le néphron	6
1.4. Mécanisme de régulation de la réabsorption de sodium	9
1.5. Réabsorption de sodium dans les segments sensibles à l'aldostérone	13
2. L'aldostérone.....	13
2.1. Biosynthèse de l'aldostérone	13
2.2. Régulation de la sécrétion d'aldostérone	16
3. Le Récepteur Minéralocorticoïde.....	17
3.1. Gènes, transcrits et protéine MR	17
3.2. Sites d'expression du MR	20
3.3. Expression biphasique du MR au cours du développement rénal.....	22
3.4. Mécanismes d'action du MR.....	24
3.5. Les mécanismes de régulation de l'expression et de la fonction du MR	35
4. MicroARNs (miARNs).....	41
4.1. Généralités	41
4.2. Biogenèse et dégradation des miARNs	41
4.3. Nomenclature des miARNs.....	47
4.4. Fonctions des miARNs	48
4.5. Mécanisme de répression post-transcriptionnelle	50
4.6. Dialogues croisés entre les protéines de liaison à l'ARN et les miARNs	56
4.7. Sécrétion et libération des miARNs dans le milieu extracellulaire	58
5. Rôle des miARNs en physiologie et physiopathologie rénale	61
5.1. Rôle des miARNs en physiologie rénale	61

5.2. Dérèglement de l'expression des miARNs dans certaines pathologies rénales.....	64
5.3. Les miARNs : Biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de certaines maladies rénales.	67
5.4. Les miARNs et leur potentiel thérapeutique.....	70
OBJECTIFS DE LA THESE	73
RESULTATS - DISCUSSIONS	75
Partie 1 : Contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du récepteur minéralocorticoïde par les miARNs en réponse à un stress hypertonique.....	75
1. Justification du projet.....	75
2. Résultats	77
<i>Article 1 : miR-324-5p and miR-30c-2-3p Alter Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling Under Hypertonicity</i>	
3. Eléments supplémentaires de discussion	79
Partie 2 : Rôle des miARNs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du récepteur minéralocorticoïde durant la période périnatale	85
1. Justification du projet.....	85
2. Résultats	88
<i>Article 2 : Involvement of miR-324-5p and miR-30c-2-3p in the Post-transcriptional Control of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression During the Perinatal Period</i>	
3. Eléments de discussion	112
DISCUSSION GENERALE	118
CONCLUSION GENERALE	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	130
ANNEXES	
<i>Article 3 : Sexual Dimorphisme of Corticosteroid Signaling During Kidney Development</i>	
<i>Article 4 : The Invention of Aldosterone, How the past Resurface on Pediatric Endocrinology</i>	

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Anatomie détaillé du rein et structure du néphron	2
Figure 2 : La concentration de l'urine et le gradient cortico-papillaire rénal	4
Figure 3 : Réabsorption de sodium dans les différents segments du néphron	7
Figure 4 : Topologie des principaux segments du néphron et site d'action des hormones	11
Figure 5 : La glande surrénale et la biosynthèse des hormones corticostéroïdes	15
Figure 6 : Le récepteur minéralocorticoïde humain : le gène, les transcrits et les variants protéiques	18
Figure 7 : Tissus exprimant le MR.....	21
Figure 8 : Expression biphasique du MR au cours du développement rénal.....	23
Figure 9 : Mécanisme d'action du MR.....	25
Figure 10 : Dualité entre les voies minéralocorticoïde et glucocorticoïde rénales et mécanismes de sélectivité de l'action de l'aldostérone sur le MR	33
Figure 11 : Différents niveaux de contrôle de l'expression et/ou de la fonction du MR	36
Figure 12 : Biogenèse et mécanisme d'action des microRNAs	43
Figure 13 : Structure des protéines Argonautes (Ago) et GW182 humain	46
Figure 14 : Interaction miARN-ARNm.....	52
Figure 15 : Mécanismes de répression des miARN	54
Figure 16 : Modèle de liaison combinatoire entre RBP-miARN sur la région 3'-UTR des ARNm.....	57
Figure 17 : Les différentes formes des miARN sécrétés dans le milieu extracellulaire.....	59
Figure 18 : Implication des miARNs dans différentes néphropathies.....	65
Figure 19 : Utilisation potentielle des miARNs urinaires dans les maladies rénales.....	69
Figure 20 : Lien entre l'expression rénale du MR et les variations d'osmolalité du liquide amniotique durant la période périnatale	87
Figure 22 : Impact de Furosémide sur le volume urinaire et l'excrétion urinaire de sodium.....	120
Figure 23 : Corrélation entre l'expression de Tis11b et du MR en période périnatale.....	123
Figure 24 : Sécrétion de miR-324-5p et de miR-30c-2-3p en réponse à l'hypertonie.....	127
Tableau 1 : Récapitulation des corégulateurs connus interagissant avec le MR	27
Tableau 2 : Nomenclature des miARNs	47
Tableau 3 : Exemple d'une combinaison dans la nomenclature des miARNs et leur complexité	48
Tableau 4 : Dérèglement de l'expression de miARNs urinaires dans les maladies rénales	70

LISTE DES ABREVIATIONS

3'-UTR ou 5'-UTR	<i>3'-Untranslated Region ou 5'-Untranslated Region</i> , région non traduite
Aa	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyribonuNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AGO	Argonaute
AQP	Aquaporine
ASDN	<i>Aldosterone Sensitive Distal Nephron</i>
AR	<i>Androgen Receptor</i> , Récepteur des Androgènes
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ARNr	ARN ribosomal
ARE	<i>Adenosine-Uridine Rich Element</i>
ATG	<i>AuTophagy-related proteins</i>
CCD	<i>Cortical Collecting Duct</i> , Canal Collecteur Cortical
CDS	<i>Coding Sequence</i> , séquence codante
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i> , immunoprécipitation de la chromatine
DCT	<i>Distal Convolved Tubule</i> , Tubule Contourné Distal
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome Critical Region gene 8</i>
Elavl1	<i>Embryonic lethal, abnormal vision, drosophila homolog-Like 1</i>
ENaC	<i>Epithelial Sodium Channel</i> , canal épithélial à sodium
EXP5	<i>Exportin 5</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i> , Récepteur des Œstrogènes
Gilz	<i>Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper</i>
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i> , Récepteur Glucocorticoïde
HDAC	Histone Désacétylases
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
HuR	<i>Human antigen R</i>
IgA	Immunoglobuline A

IRA	Insuffisance rénale aigüe
IRC	Insuffisance rénale chronique
kDa	kilo Dalton
KS-WNK1	<i>Kidney specific WNK1</i>
miARN	microARN
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
m ⁷ G	7-methylguanosine
MCD	<i>Medullary Collecting duct</i> , canal collecteur médullaire
MICD	<i>Medullary Internal Collecting Duct</i> , canal collecteur médullaire interne
MOCD	<i>Medullary Outer Collecting Duct</i> , canal collecteur médullaire externe
MR	<i>Mineralocorticoid Receptor</i> , Récepteur Minéralocorticoïde
ND	Néphropathie diabétique
NES	<i>Nuclear Export Signal</i> , signal d'export nucléaire
NFAT5	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells 5</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> , signal de localisation nucléaire
Nt	nucléotide
pb	paire de bases
PCT	<i>Proximal Convoluted tubule</i> , tubule contourné proximal
PKD	<i>Polykystic Kidney Disease</i> , maladie polykystique des reins
pré-miARN	miARN précurseur
pri-miARN	miARN primaire
RBP	<i>RNA Binding Protein</i> , Protéine de liaison à l'ARN
RISC	<i>RNA Induced Silencing complex</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SG	Semaine de Gestation
Sgk1	<i>Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1</i>
TAL	<i>Thick Ascending Limb</i> , branche ascendante de l'anse de Henlé
TDL	<i>Thick Descending Limb</i> , branche descendante de l'anse de Henlé
TGF- β	<i>Tumor Growth Factor β</i>
Tis11b	<i>Tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11b</i>

TonE	<i>Tonicity responsive Element</i>
TonEBP	<i>Tonicity responsive Enhancer Binding Protein</i>
TTP	<i>Tristetraprolin</i>
Zfp36l1	<i>ZFP36 ring finger protein like 1</i>
WNK1	<i>With No lysine 1</i>
WT	<i>Wilms Tumor, tumeur de Wilms</i>

NB : Les abréviations anglaises sont indiquées en italiques

LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications présentées dans cette thèse

Article 1

miR-324-5p and miR-30c-2-3p Alter Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling Under Hypertonicity.

Thi An Vu, Ingrid Lema, Lydie Cheval, Imene Hani, Laura Atger-Lallier, Vilayvane Souvannarath, Mélanie Souvanheuan, Yannick Marie, Sylvie Fabrega, Anne Blanchard, Jerome Bouligand, Peter Kamenický, Gilles Crambert, Laetitia Martinerie, Marc Lombès, Say Viengchareun.

Cellular and Molecular Life Sciences, 2021, manuscrit en révision.

Article 2

Involvement of miR-324-5p and miR-30c-2-3p in the Post-Transcriptional Control of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression During the Perinatal Period

Imene Hani, **Thi An Vu**, Julie Perrot, Laura Atger-Lallier, Eric Pussard, Pascal Boileau, Peter Kamenický, Marc Lombès, Say Viengchareun*, Laetitia Martinerie*.

*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente.
Manuscrit en cours de préparation.

Publications présentées en Annexe

Article 3

Sexual Dimorphism of Corticosteroid Signaling During Kidney Development. Special Issue on "Sexual Dimorphism in (Non Reproductive) Endocrine Diseases".

Margaux Laulhé, Laurence Dumeige, **Thi An Vu**, Imene Hani, Eric Pussard, Marc Lombès, Say Viengchareun, Laetitia Martinerie.
Int J Mol Sci. 2021 May 18;22(10):5275.

Article 4

The Invention of Aldosterone, How the past Resurfaces on Pediatric Endocrinology. Special Issue on "The Adrenal Gland: Development, Function and Tissue Maintenance".

Say Viengchareun, Eric Pussard, Mireille Castanet, Laurent M. Sachs, **Thi An Vu**, Pascal Boileau, Marc Lombès, Laetitia Martinerie.
Molecular and Cellular Endocrinology, 2021 Jun 29; 535:111375.

Communications orales

2018

MicroRNA 324-5p inhibits Renal response to Aldosterone by posttranscriptional control of mineralocorticoid receptor expression.

Thi An Vu, Ingrid Lema, Jérôme Bouligand, Laetitia Martinerie, Marc Lombès, Say Viengchareun.

Symposium international ESAC/ADMIRE sur l'Aldostérone et le Récepteur Minéralocorticoïde.
Erlangen, Allemagne, du 7 au 8 Décembre, 2018.

2017

Le microARN 324-5p inhibe la réponse rénale à l'Aldostérone par le contrôle post-transcriptionnel de l'expression du récepteur minéralocorticoïde.

Thi An Vu, Ingrid Lema, Jérôme Bouligand, Laetitia Martinerie, Marc Lombès, Say Viengchareun.
34ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie.

Poitiers, France, du 11 au 14 Octobre 2017.

Annales d'Endocrinologie, Volume 78, Issue 4, Septembre 2017, pages 216 – 217.

Meilleur prix de communication orale

Communications sous forme de poster

2019

MicroRNAs Regulate Aldosterone Signaling by Post-transcriptional Control of Mineralocorticoid receptor expression.

Thi An Vu, Ingrid Lema, Jérôme Bouligand, Laetitia Martinerie, Marc Lombes, Say Viengchareun.

21^{ème} European Congress of Endocrinology.

Lyon, France, du 18 au 21 Mai, 2019.

AVANT-PROPOS

Après avoir achevé ma formation de médecin et ma spécialisation en pédiatrie au Vietnam, j'ai souhaité devenir médecin-chercheur en Endocrinologie Pédiatrique, c'est pourquoi j'ai décidé de me former à la recherche scientifique, qui doit me permettre non seulement de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués en physiopathologie humaine, mais aussi de faciliter une prise en charge optimale des patients, et de nourrir ma réflexion scientifique, afin d'en tirer des leçons précieuses.

J'ai eu la chance d'avoir été accueillie et encadrée, depuis mes premiers stages de recherche de Master 1 et de Master 2 au sein de l'Unité Inserm 1185 « Physiologie et Physiopathologie Endocriniennes », sous la direction scientifique du Dr Marc Lombès et du Dr Say Viengchareun. Dans ce laboratoire, j'ai pu bénéficier d'un bon environnement de recherche, d'enseignements enthousiasmants d'excellente qualité, ainsi que d'échanges scientifiques très enrichissants. Rapidement, j'ai pu m'intégrer dans le monde de la recherche, qui était très nouveau pour moi, et je peux, à présent, mettre en œuvre mes connaissances théoriques et pratiques de la recherche.

Dès mon arrivée dans le laboratoire, j'étais soucieuse de pouvoir me perfectionner et d'aller le plus loin possible dans ce domaine d'excellence, afin de me préparer à une carrière de médecin-chercheur en Endocrinologie Pédiatrique. L'obtention de résultats originaux et prometteurs durant mon Master 2, m'a fortement motivée à poursuivre ce projet dans le cadre d'une Thèse de Sciences sous la direction du Dr Say Viengchareun.

Ces années de Thèse ont été vraiment passionnantes et enrichissantes. En effet, j'ai pu m'investir pleinement dans cette thématique de recherche très novatrice qui portait sur l'étude du rôle des microARNs (miARNs) dans la régulation de l'expression du Récepteur Minéralocorticoïde (MR) en physiologie et physiopathologie rénale même si j'ai été confrontée, durant ma thèse, à certaines difficultés soit liées aux choix des techniques et des méthodes, soit liées à la pandémie de la Covid-19. Durant cette thèse, j'ai ainsi pu décrypter un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR, qui implique le recrutement de miARNs, en réponse aux variations de tonicité, qui prévalent dans les segments néphroniques. Par la suite, j'ai pu examiner si les miARNs identifiés sont impliqués dans la régulation de l'expression du MR durant la période périnatale, durant laquelle les nouveau-nés présentent une perte physiologique d'eau et de sel, qui conduit à une perte de poids dans les premiers jours de vie.

Ce manuscrit présente les travaux de mes 5 années de recherche ayant abouti à un article principal dont je suis premier auteur et qui est actuellement en révision et à deux revues.

Ce manuscrit débutera par une Introduction Générale comportant 3 parties principales : la première partie décrit la physiologie de la réabsorption de sodium, avec un petit rappel sur l'anatomie et les grandes fonctions des reins ; la seconde partie décrit la biosynthèse de l'aldostérone et le mécanisme d'action du MR ainsi que les mécanismes de régulation de l'expression et de la fonction du MR dans le rein. La troisième partie présente les généralités et le mécanisme d'action des miARNs, qui représentent une autre classe de régulateurs post-transcriptionnels susceptibles de moduler l'expression rénale du MR. Enfin, le rôle des miARNs en physiologie et en physiopathologie rénale sera brièvement abordé.

Le chapitre Résultats - Discussions sera découpé en 2 parties : la première partie porte sur l'étude du contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR par deux miARNs (miR-324-5p et miR-30c-2-3p) en réponse au stress hypertonique. Le manuscrit est en ce moment en révision dans le journal « *Cellular and Molecular Life Sciences* ». Il sera précédé d'une brève introduction permettant de comprendre le contexte de l'étude et l'hypothèse de travail et sera complété avec des éléments de discussion présentant les limites et les perspectives de cette étude. Dans la seconde partie, j'exposerai, sous la forme d'un manuscrit, en cours de préparation, les résultats préliminaires que j'ai contribués à obtenir sur le rôle de ces deux miARNs candidats dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du MR durant la période périnatale.

Une Discussion Générale permettra de mettre en perspective l'ensemble du travail effectué. Je terminerai alors ce manuscrit avec un chapitre « Conclusion Générale ». Enfin, deux revues auxquelles j'ai participé seront présentées en annexe dans ce manuscrit.

INTRODUCTION

1. Physiologie de la réabsorption de sodium

1.1. Anatomie des reins et structure des néphrons

Les reins, organes pairs, appartiennent à l'appareil urinaire et assurent des fonctions majeures dans l'organisme. La fonction la plus importante des reins consiste à maintenir constant l'équilibre du bilan hydrosodé (entrées et sorties d'eau et d'ions sodium). Une autre fonction importante du rein est d'éliminer les déchets et d'excréter les produits de dégradation du métabolisme cellulaire (urée, créatinine) et les substances étrangères de l'organisme. Cet organe exerce également plusieurs autres fonctions : une fonction endocrine avec la synthèse de la rénine qui contribue à la régulation de la pression artérielle systémique, un rôle dans l'érythropoïèse (synthèse d'érythropoïétine) responsable de la stimulation des globules rouges par la moelle osseuse et un rôle dans le métabolisme phosphocalcique important pour la minéralisation de l'os.

Anatomie des reins et voies urinaires

Les reins humains sont deux organes rétropéritonéaux et paravertébraux pesant chacun approximativement 150 g. Leurs dimensions sont d'environ 11 à 12 cm de longueur (la hauteur de trois vertèbres sur les clichés radiologiques), 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur (Gougoux, 2009). Le rein droit est habituellement un peu plus bas et un peu plus petit (différence de 0,5 cm) que le rein gauche. Une capsule fibreuse et résistante entoure chaque rein. Le hile est localisé à l'intérieur du rein et contient l'artère rénale, la veine rénale et le bassinnet.

La **Figure 1A** montre une coupe sagittale de rein présentant une région externe d'environ 1 cm d'épaisseur, le cortex, entourant une région interne, la médullaire. La médullaire se divise en une médullaire externe et une médullaire interne. La médullaire est formée de pyramides de Malpighi qui se terminent par la papille où l'urine terminale est excrétée dans le calice. Entre les pyramides se trouvent les colonnes de Bertin où les artères interlobaires pénètrent pour se ramifier et vasculariser le parenchyme rénal. Le bassinnet est une structure en forme d'entonnoir et constituée de calices mineurs et majeurs. L'uretère prend origine à la portion inférieure du bassinnet, à la jonction pyélo-urétérale et chemine sur environ 30 cm puis se termine dans la vessie qui permet l'élimination des urines.

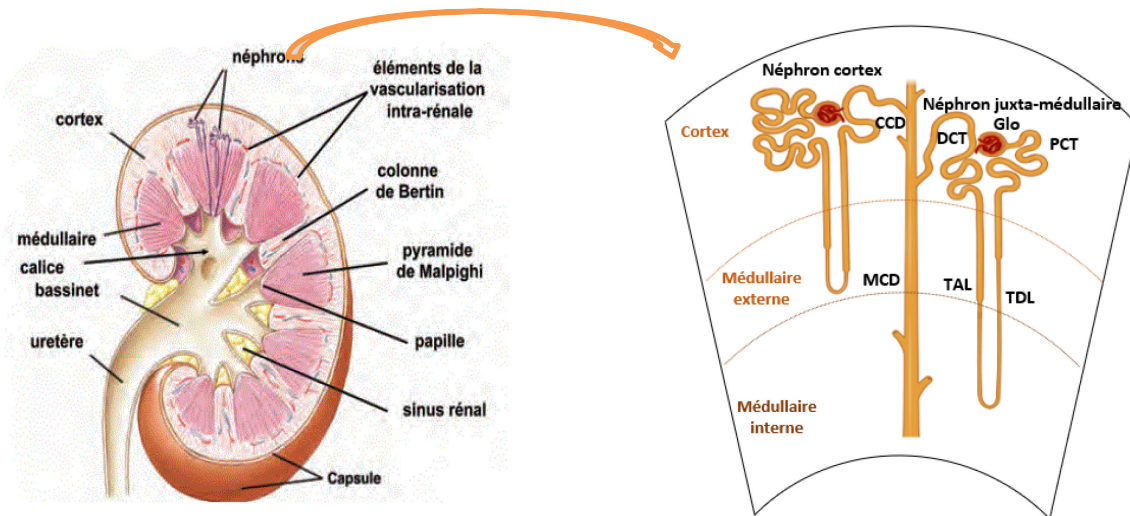


Figure 1 : Anatomie détaillé du rein et structure du néphron

- A. Coupe sagittale du rein (d'après Lacour, 2013)
- B. Schéma montrant deux types de néphron dans les zones du parenchyme rénale (d'après Mount, 2014)
 Glo : glomérule, PCT : tubule contourné proximal, TDL : branche descendante de l'anse de Henlé, TAL : branche ascendante de l'anse de Henlé, DCT : tubule contourné distal, CCD : canal collecteur cortical, MCD : canal collecteur médullaire

Structure des néphrons

L'élaboration de l'urine résulte du travail effectué par les néphrons - unités microscopiques structurales et fonctionnelles des reins. Chaque rein humain possède de 1 à 1,5 million de néphrons (Lacour, 2013). Chaque néphron est constitué de deux parties : le glomérule où s'effectue la filtration du sang et le tubule rénal assurant la réabsorption de l'eau, du sodium et la sécrétion de potassium pour former l'urine primitive.

Le glomérule ou le corpuscule rénal (Corpuscule de Malpighi), est un réseau de capillaires situés dans une extrémité dilatée du tubule rénal et toujours placé dans le cortex rénal. Ce réseau de capillaires glomérulaires, qui est composé du glomérule et la capsule de Bowman, est situé entre l'artériole afférente (pré-glomérulaire) et l'artériole efférente (post-glomérulaire). Le glomérule se compose de quatre sortes de cellules : les cellules endothéliales, les cellules mésangiales, les cellules épithéliales viscérales et pariétales. Le glomérule permet la filtration du plasma dans la lumière des capillaires

glomérulaires vers le liquide tubulaire (environ 180 litres de plasma sont ultrafiltrés par jour avec un débit de filtration de 125 ml/min) (Gueutin et al., 2012).

Le tubule rénal est tapissé d'une couche unique de cellules épithéliales qui servent de barrière entre le milieu intérieur et l'environnement extérieur ce qui représente la lumière tubulaire. Deux membranes distinctes entourent chaque cellule tubulaire rénale qui est polarisée, la membrane apicale ou luminale, bordant la lumière tubulaire, et la membrane basolatérale longeant les espaces latéraux intercellulaires et le liquide interstitiel pérítubulaire. Une structure composée de jonctions serrées relie les cellules tubulaires près de leur surface luminale. Il y a quatre segments qui se succèdent le long du tubule rénal très hétérogène et qui diffèrent aussi bien morphologiquement que fonctionnellement : le tubule proximal (tubules contourné proximal) ; l'anse de Henlé (qui possède une branche fine descendante et une branche fine ascendante) ; le tubule distal (comprend une portion droite, la branche ascendante large de l'anse de Henlé et le tubule contourné distal) ; le tubule collecteur (qui vient de la fusion d'une dizaine de néphrons et dans lequel se jettent les tubules distaux), renferme le tubule connecteur, le canal collecteur cortical, le canal collecteur médullaire externe et le tubule collecteur médullaire interne.

Le tubule proximal qui fait directement suite au glomérule assure la réabsorption massive d'eau et de solutés. L'anse de Henlé permet la création et le maintien du gradient cortico-papillaire, nécessaire à la concentration de l'urine finale. Le néphron distal qui comprend le tubule contourné distal, le tubule connecteur et le canal collecteur assure l'ajustement final de l'excrétion des électrolytes et de l'eau. L'épithélium du tubule collecteur contient deux sortes de cellules. D'abord, les cellules claires ou principales, les plus abondantes, réabsorbent l'eau et le sodium et sécrètent le potassium. D'autre part, les cellules foncées ou intercalaires sont responsables de l'acidification urinaire. Les cellules intercalaires de type A sécrètent les protons et réabsorbent le bicarbonate, tandis qu'à l'inverse les cellules moins nombreuses de type B sécrètent le bicarbonate et réabsorbent les protons (Gougoux, 2009; Gueutin et al., 2012).

Il y a deux populations de néphron : les néphrons corticaux et les néphrons juxta-médullaires (**Figure 1B**). La longueur de l'anse de Henlé permet de différencier ces deux populations de néphrons. Les néphrons juxta-médullaires ont la plus grande longueur de l'anse de Henlé et s'enfoncent profondément dans la médullaire rénale alors que les néphrons corticaux restent plus superficiels et représentent 85 % des néphron totaux (Mount, 2014).

1.2. Le gradient cortico-papillaire

Les reins maintiennent un gradient osmotique « cortico-papillaire » au sein de l'interstitiel entre la partie corticale et la partie médullaire rénale. Le tissu cortical est isotonique au plasma et celui de l'extrémité médullaire interne est hypertonique au plasma (Knepper, 1982; Nawata and Pannabecker, 2018). L'osmolalité du milieu interstitiel ou *interstitium* croît de 300 mOsm/kg dans le cortex à 600 mOsm/kg dans la médullaire externe, jusqu'à 1200 mOsm/kg dans la médullaire interne (Dantzer et al., 2014; Gougoux, 2009; Nawata and Pannabecker, 2018) (**Figure 2**). C'est un système à contre-courant multiplicateur, qui va concentrer de plus en plus les urines passant le long du tubule rénal plus précisément au niveau de branche large descendante.

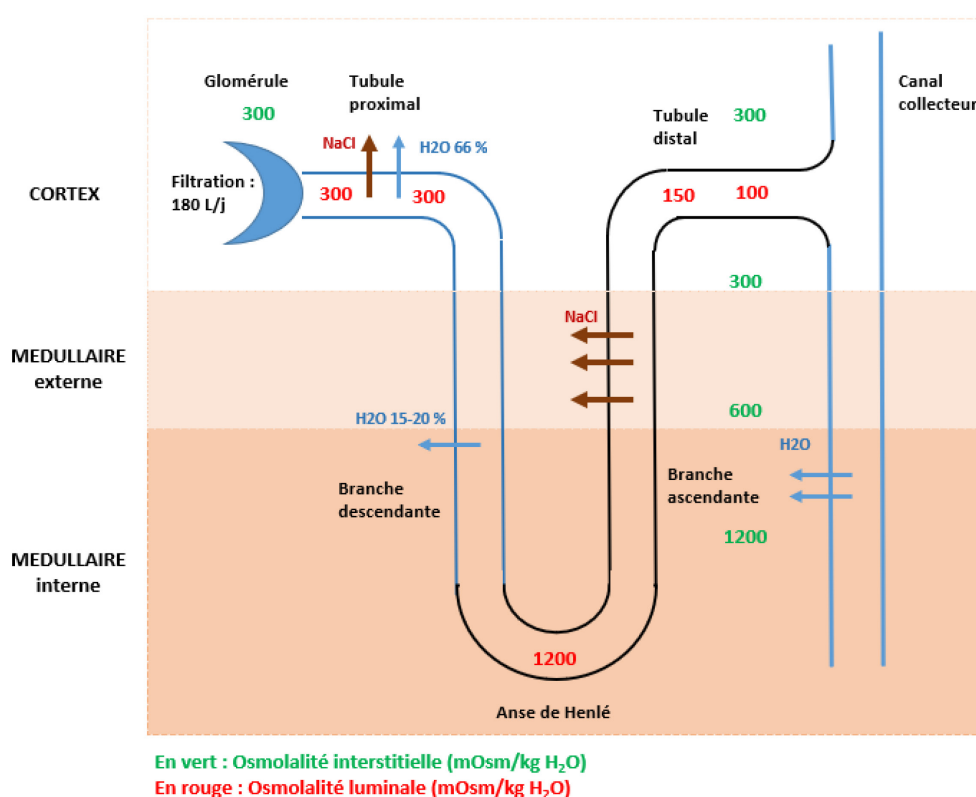


Figure 2 : La concentration de l'urine et le gradient cortico-papillaire rénal

(D'après Gougoux, 2009)

La **Figure 2** illustre la différence de perméabilité à l'eau entre les divers segments du néphron. Les segments de l'épithélium tubulaire sont perméables à l'eau (en bleu) ou imperméables à l'eau (en noir), ou leur perméabilité à l'eau peut varier selon les besoins de l'organisme.

La première partie du néphron (le tubule proximal et la branche descendante de l'anse de Henlé) est un épithélium très perméable à l'eau, dont la réabsorption passive, selon le gradient osmotique, suit

celle des solutés. Les cellules tubulaires dans ces segments du néphron toujours perméables à l'eau possèdent, dans leurs deux membranes luminale et basolatérale, des canaux hydriques appelés aquaporine-1 (AQP1) ou CHIP28 (Nielsen et al., 1993). Ces canaux hydriques sont essentiels à la réabsorption rapide de 90 % du volume considérable de 180 L d'eau filtré chaque jour. L'aquaporine-1 n'est pas régulée par la vasopressine et est absente dans les parties plus distales du néphron. En revanche, la deuxième partie du néphron, qui correspond à la branche ascendante de l'anse de Henlé, est un épithélium complètement imperméable à l'eau. Parce qu'elle est dépourvue de canaux hydriques (Nawata and Pannabecker, 2018; Nielsen et al., 1993), sa membrane cellulaire luminale demeure imperméable à l'eau, qui ne peut pas suivre passivement le gradient osmotique résultant de la réabsorption de solutés. La différence de perméabilité entre les branches descendante et ascendante de l'anse de Henlé joue un rôle essentiel dans le mécanisme de concentration urinaire et dans la production de l'interstitium médullaire hypertonique et dans le mécanisme de concentration urinaire. Cet épithélium imperméable à l'eau est également nécessaire à la production dans la lumière tubulaire de l'eau libre de solutés et au mécanisme de dilution urinaire. Enfin, la perméabilité à l'eau des cellules du tubule collecteur varie selon la présence ou l'absence d'arginine vasopressine, l'hormone anti-diurétique (ADH) (Dantzler et al., 2014) qui augmente considérablement la perméabilité à l'eau au niveau de la membrane luminale. Cette perméabilité variable permet, selon les besoins de l'organisme, de retenir l'eau avec le mécanisme de concentration urinaire ou de l'excréter avec le mécanisme de dilution urinaire. Le tubule collecteur représente donc le principal segment du néphron régulant la réabsorption de l'eau.

Le tubule proximal, très perméable à l'eau, réabsorbe d'une façon iso-osmotique environ les deux tiers de l'eau filtrée. La réabsorption d'eau est passive, selon le gradient osmotique créé par la réabsorption de chlorure de sodium et d'autres solutés. L'osmolalité du liquide tubulaire proximale demeure donc égale à celle du plasma, que les reins concentrent ou diluent pour obtenir l'urine finale. Le tiers du liquide filtré, soit environ 60 L/j, n'est pas réabsorbé au niveau du tubule proximal et entre donc dans la branche descendante de l'anse de Henlé.

Le segment correspondant à la fin de la branche descendante de l'anse de Henlé est très perméable à l'eau, mais beaucoup moins au chlorure de sodium et à l'urée. L'osmolalité élevée du liquide interstitiel médullaire attire passivement l'eau du liquide tubulaire, dont l'osmolalité augmente alors progressivement jusqu'à une valeur maximale autour de 1200 mOsm/kg. Cette réabsorption d'eau diminue à 10 % du volume filtré, soit 18 L/j, et la quantité d'eau qui atteint ce segment du néphron peut contribuer à l'excrétion d'une urine diluée ou concentrée selon les besoins de l'organisme. A la pointe de l'anse de Henlé, avec son apparence d'épingle à cheveux, l'épithélium devient subitement

impermeable à l'eau car les canaux hydriques AQP-1 disparaissent complètement des membranes cellulaires luminale et basolatérale.

L'anse de Henlé, surtout au niveau de la branche ascendante, est la partie qui crée le gradient de pression osmotique cortico-médullaire. L'urine devient de plus en plus hypotonique et le milieu interstitiel médullaire devient de plus en plus hypertonique puisque cette partie est imperméable au mouvement osmotique de l'eau. En l'absence de canaux hydriques et de réabsorption d'eau, la réabsorption active de chlorure de sodium diminue progressivement, jusqu'à environ 100 mOsm/kg, qui correspond à l'osmolalité du liquide tubulaire. En revanche, la réabsorption de chlorure de sodium (sans eau) augmente l'osmolalité de l'interstitiel médullaire. En particulier, ce gradient interstitiel d'osmolytes est maintenu grâce à la présence de *vasa recta* parallèles aux branches de l'anse de Henlé et présentant eux même une organisation en épingle à cheveu et des perméabilités aux solutés et à l'eau particulières, ce qui leur permet de soustraire l'eau réabsorbée dans le collecteur tout en trappant les osmolytes dans l'interstitiel (Gougoux, 2009).

Dans le canal collecteur, la perméabilité à l'eau des cellules est contrôlée par l'hormone anti-diurétique (ADH). En présence d'ADH, il y a un passage de l'eau de la lumière du tubule rénal vers l'*interstitium* hyperosmotique, donc l'urine devient hyperosmotique. En absence d'ADH, il n'y a pas de réabsorption d'eau et l'urine devient hypoosmotique. Cette régulation est rendue possible grâce à l'expression des aquaporines-2 (AQP2) au niveau de la membrane apicale et des aquaporines-3, -4 (AQP3, AQP4) au niveau de la membrane basolatérale des cellules du canal collecteur le segment canal collecteur.

1.3. Réabsorption de sodium dans le néphron

Le rein est l'organe clé du maintien de l'homéostasie de l'eau et du sodium. Il adapte en permanence l'excrétion d'eau (la diurèse) et de sodium (la natriurèse) en fonction des entrées de sodium et d'eau afin de maintenir un bilan nul entre les entrées et les sorties. Le contrôle rénal de cette balance hydrosodée repose sur deux facteurs. Le premier facteur est le débit de filtration glomérulaire (DFG), qui définit la quantité de plasma ultrafiltré par le glomérule. En moyenne chez l'adulte, il est de 125 ml/min, soit 180 litres de plasma et 25000 mmoles de sodium/24 h. Le deuxième facteur est la réabsorption de sodium et d'eau qui est variable en fonction des différents segments néphroniques. Afin de maintenir un bilan nul, le rein réabsorbe plus de 99 % du sodium filtré par le glomérule (Devuyst, 2008).

La réabsorption de sodium s'effectue tout le long du néphron grâce à des canaux selon un gradient électrochimique et à des transporteurs (passage d'un ion contre le gradient électrochimique) qui sont exprimés à la membrane apicale et basolatérale des cellules épithéliales tubulaires.

La **Figure 3** illustre le taux de réabsorption de sodium dans différents segments néphroniques et le schéma des canaux ou transporteurs qui sont exprimés dans les cellules des différents segments néphroniques. Le tubule proximal réabsorbe environ 67 % du sodium ultrafiltré par le glomérule. La branche large ascendante de l'anse de Henlé assure 25 % de la réabsorption du sodium ultrafiltré. Le tubule contourné distale réabsorbe 5 % du sodium ultrafiltré et la tubule connecteur du canal collecteur réabsorbe 3 % de la charge filtré de sodium (Palmer and Schnermann, 2015).

Quel que soit le segment du néphron, la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, toujours localisée à la membrane basolatérale, permet la sortie de sodium de la cellule alors que les protéines membranaires, qui varient d'un segment à l'autre, assurent l'entrée de sodium par la membrane apicale.

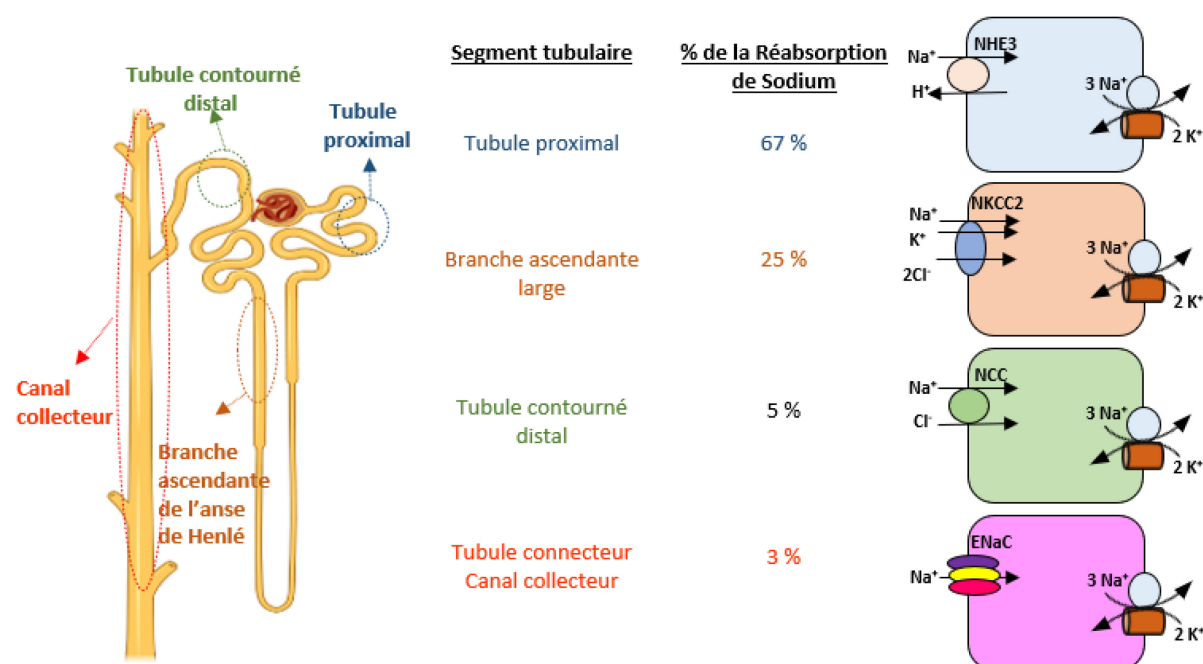


Figure 3 : Réabsorption de sodium dans les différents segments du néphron

(Taux de réabsorption de sodium d'après Palmer and Schnermann, 2015)

Tubule proximal

Le tubule proximal réabsorbe environ les deux tiers (67 %) du sodium ultrafiltré. Au début du tubule proximal, la réabsorption de sodium est couplée à celle du glucose, des acides aminés, du phosphate et du bicarbonate. Du côté apical, le tubule proximal exprime l'échangeur sodium/proton NHE3 (Biemesderfer et al., 1993), qui assure la réabsorption des deux tiers du sodium ultrafiltré. Son activité

est dépendante de l'anhydrase carbonique. Cette enzyme est exprimée dans la plupart des segments du néphron. Il existe plusieurs isoformes et les isoformes II, IV sont prédominantes dans le rein chez l'homme (Purkerson and Schwartz, 2007). L'isoforme, qui est exprimée à la membrane apicale, en contact avec la lumière tubulaire, est l'isoforme IV. Le proton est transporté de la cellule vers la lumière du tubule par l'échangeur NHE3. Dans la lumière tubulaire, il s'associe à un ion bicarbonate pour former l'acide carbonique H_2CO_3 transformé par l'anhydrase carbonique IV en CO_2 et H_2O . Le CO_2 peut traverser la membrane apicale de façon passive et retourner dans la cellule. De cette manière, l'anhydrase carbonique IV réalise un cycle permettant la réabsorption des ions bicarbonate et sodium.

Branche ascendante de l'anse de Henlé

Alors que la branche descendante de l'anse de Henlé ne réabsorbe pas le sodium, la branche ascendante fine réabsorbe environ 25 % du sodium ultrafiltré selon un gradient de concentration. La réabsorption active de sodium dans la branche ascendante large requiert l'activité de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Comme dans la cellule tubulaire proximale, cette pompe maintient une concentration intracellulaire de sodium basse. Le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2) contribue à la réabsorption de sodium à travers la membrane luminale. Ce cotransporteur réabsorbe un ion Na^+ et deux ions Cl^- selon le gradient électrochimique et secrète un ion K^+ contre le gradient électrochimique (Payne and Forbush, 1995). La diffusion passive des ions K^+ de la cellule vers la lumière tubulaire engendre la différence transépithéliale de potentiel, positive d'environ +10 mV. Celle-ci favorise la réabsorption passive, par la voie paracellulaire, de sodium et d'autres cations comme le calcium et le magnésium. Différentes mutations génétiques avec perte de fonction de ce cotransporteur sont responsables du Syndrome de Bartter (Simon et al., 1996). Le furosémide, le bumétanide et l'acide éthacrynique sont des diurétiques qui ciblent ce segment néphronique. Ce sont des inhibiteurs du cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, qui en se liant à son site chlore, augmentent l'excrétion urinaire de sodium, de potassium et de chlore. Ils augmentent aussi l'excrétion urinaire d'autres ions divalents tels que le calcium, le magnésium et le phosphate.

Tubule contourné distal

Ce segment du néphron, avec une différence transépithéliale de potentiel de -40 mV, réabsorbe activement environ 5 % du sodium ultrafiltré. L'activité de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ permet la réabsorption active de sodium à travers la membrane basolatérale. Au niveau de la membrane apicale, le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) réabsorbe le sodium selon son gradient électrochimique et le chlore contre son gradient électrochimique (de Jong et al., 2003). Diverses mutations génétiques avec perte de fonction de ce cotransporteur sont responsables du Syndrome de Gitelman (Knoers and Levchenko, 2008). Dans ce segment néphronique, les diurétiques thiazidiques comme

l'hydrochlorothiazide et l'indapamide inhibent l'action du cotransporteur $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$, donc l'excrétion urinaire de sodium augmente.

Tubule connecteur et canal collecteur

Le canal collecteur traverse toute la hauteur du rein, débute à l'extrémité distale du tubule contourné distal dans le cortex (canal connecteur) et traverse toute la médullaire avec trois parties : le canal collecteur cortical, le canal collecteur médullaire externe et le canal collecteur interne. Il participe à la réabsorption finale de sodium et d'eau, finement régulée pour aboutir à un bilan nul, essentiel pour maintenir une volémie et une pression artérielle normale en physiologie (Féraïlle and Doucet, 2001). Les cellules principales du tubule collecteur réabsorbent activement environ 3 % du sodium ultrafiltré. La réabsorption de sodium est rendue possible grâce au Canal épithélial à sodium (ENaC) du côté apical et à la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Loffing and Schild, 2005). Au niveau de la membrane apicale, l'entrée de sodium par le canal ENaC se fait selon le gradient électrochimique. La sortie active de sodium repose sur la force motrice générée par l'activité de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ qui permet la sortie de trois ions Na^+ contre l'entrée de deux ions K^+ .

1.4. Mécanisme de régulation de la réabsorption de sodium

Il y a trois facteurs principaux intra-rénaux régulant de façon intégrée la réabsorption de sodium : la balance glomérulo-tubulaire et les facteurs physiques agissant au niveau des capillaires péri-tubulaires, les hormones natriurétiques ou anti-natriurétiques et les nerfs sympathiques rénaux.

Balance glomérulo-tubulaire et facteurs physiques agissant au niveau des capillaires péri-tubulaires

Cette balance signifie qu'on réabsorbe, surtout au niveau du tubule proximal, la même fraction de charge d'eau et de solutés, même si la filtration glomérulaire varie en fonction de diverses situations physiologiques, tels que les changements de la pression artérielle, l'exercice physique ou un repas riche en protéines. La hausse du volume filtré accélère la réabsorption tubulaire en diminuant la pression hydrostatique et en augmentant la pression oncotique dans les capillaires péri-tubulaires. A l'inverse, la baisse du volume filtré ralentit la réabsorption en augmentant la pression hydrostatique et en diminuant la pression oncotique dans les capillaires péri-tubulaires. La filtration glomérulaire est donc le principal facteur régulant la réabsorption tubulaire. Sans cet équilibre entre la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire, toute hausse, même petite, de la filtration glomérulaire inonderait rapidement le néphron distal, dont la capacité de réabsorption demeure limitée. Cette filtration augmentée entraînerait alors la perte d'énormes quantités d'eau et d'électrolyte dans l'urine. Ainsi, une élévation de seulement 5 % de la filtration glomérulaire, soit de 9 L/j, entraînerait dans

l'urine la perte de 9 L de liquide extracellulaire en l'absence de toute balance glomérulo-tubulaire (Gougoux, 2009).

Régulation hormonale

Le maintien du volume du liquide extracellulaire requiert l'interaction complexe de plusieurs hormones augmentant ou diminuant la réabsorption tubulaire de chlorure de sodium et d'eau au niveau des segments néphroniques (Gougoux, 2009). Dans leur revue, Féraille et Doucet ont indiqué les principales hormones contrôlant la réabsorption de sodium dans 3 segments néphroniques : le tubule proximal, la branche ascendante large de l'anse de Henlé et le canal connecteur (**Figure 4**).

Hormones natriurétiques diminuant la réabsorption du sodium

- **Le peptide natriurétique auriculaire (ANP)** inhibe la réabsorption du sodium par le canal ENaC exprimé à la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur dans la médullaire interne. L'ANP inhibe aussi la sécrétion de vasopressine par l'hypophyse postérieure et, par conséquent, la réabsorption d'eau par le tubule collecteur.
- **L'urodilatine**, un peptide natriurétique ressemblant à l'ANP, mais sécrété par le tubule distal et le collecteur, inhibe la réabsorption de chlorure de sodium et d'eau par le tubule collecteur dans la médullaire interne.
- **La dopamine** est une catécholamine, produite localement dans le tubule proximal à partir de la L-dopa, qui inhibe la réabsorption proximale et distale de chlorure de sodium et d'eau. Cet effet résulte d'une inhibition de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, exprimée à la membrane basolatérale, et des différents transporteurs, comme l'échangeur Na^+/H^+ , qui participent à la réabsorption du sodium à travers la membrane apicale.
- **Les prostaglandines** inhibent la réabsorption de chlorure de sodium dans le tubule collecteur. Parce qu'elles préviennent l'effet de la vasopressine sur la perméabilité de l'eau, elles inhibent aussi la réabsorption d'eau dans ce segment du néphron.
- **La bradykinine** inhibe la réabsorption de chlorure de sodium et d'eau dans le tubule collecteur.
- **Le monoxyde d'azote (NO)** inhibe la réabsorption du sodium au niveau du tubule proximal, de la branche ascendante large de l'anse de Henlé, du tubule distal et du tubule collecteur cortical.

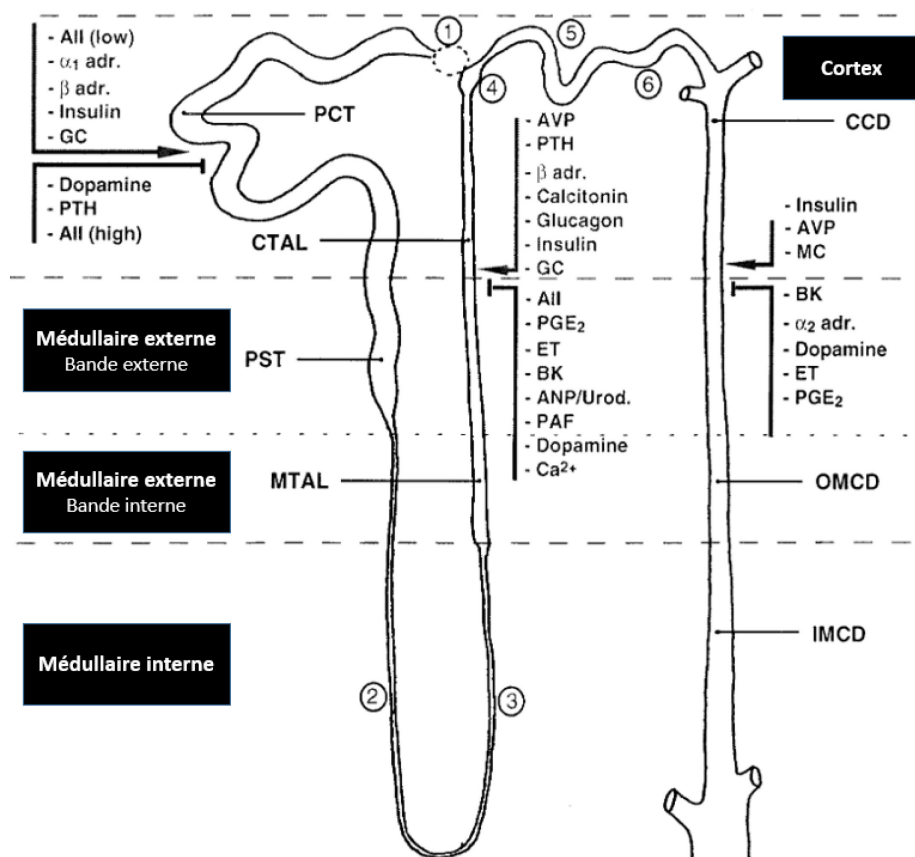


Figure 4 : Topologie des principaux segments du néphron et site d'action des hormones contrôlant le transport du sodium

(D'après Féraille and Doucet, 2001)

Représentation schématique d'un néphron avec ses portions successives : 1) glomérule ; PCT : tubule contourné proximal ; PST : tubule droit proximal ; 2) branche descendante fine de l'anse de Henlé ; 3) branche ascendante fine ; MTAL : branche ascendante large médullaire de l'anse de Henlé ; CTAL : branche ascendante large corticale ; 4) macula densa ; 5) tubule contourné distal ; 6) canal de connexion ; CCD : canal collecteur cortical ; OMCD : canal collecteur médullaire externe ; IMCD : canal collecteur médullaire interne.

Les principales hormones contrôlant dans 3 segments néphroniques (le tubule proximal, la branche ascendante large de l'anse de Henlé, et le canal collecteur), qui stimulent (\rightarrow) ou répriment (\dashv) la réabsorption du sodium : ANG II, angiotensine II ; adr : agonistes adrénergiques ; AVP : arginine vasopressine ; PTH : hormone parathyroïdienne ; GC : glucocorticoïdes ; MC : minéralocorticoïdes ; PGE₂ : prostaglandine E₂ ; ET : endothéline ; ANP/Urod : peptide natriurétique auriculaire et urodilatine ; PAF : facteur d'activation des plaquettes ; BK : bradykinine.

Hormones anti-natriurétiques qui augmentent la réabsorption du sodium

- **L'angiotensine II**, produite localement dans les reins, mais aussi sous forme circulante, accélère d'une façon marquée la réabsorption de chlorure de sodium et d'eau dans le tubule proximal. L'angiotensine II augmente aussi la réabsorption de bicarbonate de sodium en stimulant l'activité de l'échangeur Na⁺/H⁺ dans la membrane luminale et celle du cotransporteur sodium/bicarbonate dans la membrane basolatérale

- **L'aldostérone** joue un rôle primordial dans la réabsorption de sodium dans les segments sensibles à l'aldostérone. Cette hormone augmente, d'une part, la perméabilité de la membrane apicale au sodium et permet son entrée dans la cellule principale par le canal ENaC. Elle stimule, d'autre part, l'activité de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPase}$ et la réabsorption active de sodium à travers la membrane basolatérale.
- **L'épinéphrine (adrénaline)**, produite par la médullosurrénale, et la norépinéphrine (noradrénaline), libérée localement par les terminaisons nerveuses sympathiques rénales, sont des catécholamines accélérant la réabsorption de chlorure de sodium et d'eau dans chacun des segments du néphron (le tubule proximal, la branche ascendante large de l'anse de Henlé, le tubule distal et le tubule collecteur).
- **L'arginine vasopressine** augmente la réabsorption de sodium au niveau de la branche ascendante large de l'anse de Henlé et du tubule collecteur.

Nerfs sympathiques rénaux

Les nerfs sympathiques innervent les artérioles afférentes et efférentes des glomérules, des différents segments du néphron et de l'appareil juxtaglomérulaire. Ces fibres adrénergiques influencent le débit sanguin rénal, la filtration glomérulaire, la sécrétion de rénine par l'appareil juxtaglomérulaire et la réabsorption tubulaire de sodium. Il existe une relation réciproque entre le volume du liquide extracellulaire et l'activité nerveuse sympathique rénale, celle-ci augmentant avec une contraction de volume et diminuant, au contraire, avec une expansion (Burnstock and Loesch, 2017; Gougoux, 2009).

La stimulation sympathique diminue la natriurèse par trois mécanismes. D'abord, la plus sensible est la stimulation sympathique aboutissant à la libération de rénine, qui augmente la production d'angiotensine II et la sécrétion d'aldostérone, deux hormones qui accélèrent la réabsorption tubulaire de sodium. Il y a aussi une stimulation directe de la réabsorption de chlorure de sodium dans le tubule contourné proximal et dans la branche ascendante de l'anse de Henlé. Enfin, lors d'une hypovolémie sévère, la vasoconstriction préférentielle des artérioles afférentes réduit le débit sanguin rénal, la pression hydrostatique glomérulaire, la filtration glomérulaire et la charge de sodium ultrafiltrée. Cette stimulation sympathique contribue à la rétention de sodium dans l'insuffisance cardiaque congestive et dans la cirrhose hépatique.

A l'inverse, une dénervation rénale aiguë ou une inhibition par l'hypervolémie de l'activité nerveuse sympathique rénale ralentit la réabsorption proximale de chlorure de sodium et augmente son excrétion urinaire.

1.5. Réabsorption de sodium dans les segments sensibles à l'aldostérone

Chaque segment du néphron a une spécialité : Le tubule proximal est principalement spécialisé dans la réabsorption de grandes quantités d'eau (de façon isotonique au plasma) et de solutés ainsi que dans la sécrétion acide ; l'anse de Henlé est spécialisée dans la capacité de concentrer l'urine et la génération d'un gradient cortico-papillaire ; du tubule contourné distal jusqu'au canal collecteur, l'épithélium est spécialisé dans l'équilibre hydrosodée et acido-basique (Bertocchio, 2020). Le tubule contourné distal et le système « collecteur » comprenant le tubule connecteur et le canal collecteur sont appelés les segments sensibles à l'aldostérone (ASDN) (Bachmann et al., 1999; Rossier et al., 2013). Dans ces segments, la réabsorption de sodium est très contrôlée par l'aldostérone et le récepteur minéralocorticoïde. La biosynthèse et la sécrétion de l'aldostérone, ainsi que son mécanisme d'action *via* le récepteur minéralocorticoïde dans une cellule épithéliale seront détaillés dans les parties suivantes.

2. L'aldostérone

2.1. Biosynthèse de l'aldostérone

L'aldostérone est la principale hormone minéralocorticoïde chez l'homme. Découverte en 1953 par Simson et Tait (Simpson et al., 1954; Tait et al., 2004), de nombreuses études ont depuis confirmé le rôle central de cette hormone dans l'homéostasie du sodium chez l'homme, surtout dans les segments ASDN. Cette hormone est sécrétée à partir de la zone glomérulée du cortex surrénalien. La glande surrénale se compose de deux parties : la corticosurrénale, qui permet de la synthèse des hormones corticosurrénales dont l'aldostérone, le cortisol, la corticostérone et les androgènes surrénaliens ; la médullosurrénale synthétise, quant à elle, les catécholamines (**Figure 5A**). La biosynthèse de l'aldostérone commence tôt dans le développement embryonnaire, dès la différenciation des glandes surrénales et l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse, à partir de la 24^{ème} semaine de gestation (SG) chez l'homme (Naccache et al., 2016).

La biosynthèse des hormones surrénaliennes (**Figure 5B**) fait intervenir une série d'enzymes dont le substrat initial principal est le cholestérol stocké dans les gouttelettes intra-cytoplasmiques des cellules corticosurrénales (Connell et al., 2008). Le cholestérol est tout d'abord transféré depuis la membrane externe mitochondriale vers la membrane interne de la mitochondrie sous l'action de la protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) (Stocco, 2001). Ensuite, le cholestérol est converti en prégnénolone par succession de réactions enzymatiques du cytochrome P450_{sc} (*side chain cholesterol cleavage, CYP11A1*). La prégnénolone est le précurseur commun à toutes les

hormones corticosurréaliennes : l'aldostérone, le cortisol (principale glucocorticoïde chez l'homme) et corticostérone (principale glucocorticoïde chez les rongeurs) (**Figure 5B**). La prégnénolone est ensuite convertie en progestérone, 11-déoxycorticostéone (DOC), corticostérone par une série des réactions enzymatiques. La dernière étape correspond à la conversion de la corticostérone en aldostérone grâce à l'action de l'aldostérone synthase (*CYP11B2*). L'aldostérone synthase va initialement hydroxyler le carbone 11 pour former la corticostérone, qui sera ensuite hydroxylée sur son carbone 18 pour donner la 18-hydroxycorticostérone. Ce dernier composé sera finalement oxydé sur le carbone 18 afin d'obtenir l'aldostérone (Connell et al., 2008).

La synthèse d'aldostérone, ainsi que d'autres hormones stéroïdes est régulée par des mécanismes précis établis lors de la zonation fonctionnelle de la surrénale humaine (Bassett et al., 2004; Miller and Auchus, 2011). En outre, il a été également rapporté que la synthèse de l'aldostérone et du cortisol pourraient avoir lieu dans des tissus extra-surréaliens tels que le cerveau, la peau, les adipocytes, les leucocytes, l'intestin, les poumons, les os, le cœur et le thymus (Connell et al., 2008; Miller, 2017). Pourtant, selon Miller, bien que de nombreux tissus fabriquent des stéroïdes et que de nombreuses fonctions aient été proposées pour les stéroïdes extra-surréaliens, aucun rôle essentiel n'a été prouvé pour ces stéroïdes car la perturbation de leur synthèse n'entraîne pas de troubles extra-surréaliens apparents (Miller, 2017).

Au cours du développement, la production fœtale d'aldostérone a lieu dans la zone définitive, qui est l'équivalent de la zone glomérulée du cortex surrénalien adulte. Alors que l'expression de StAR et d'autres enzymes importantes augmente progressivement au cours de la grossesse (Melau et al., 2019), l'expression de *CYP11B2* n'apparaît qu'autour de 24 SG (Naccache et al., 2016); elle augmente ensuite pour atteindre à la naissance des niveaux similaires à ceux des surrénales adultes (Johnston et al., 2018). Des concentrations plasmatiques détectables d'aldostérone sont trouvées chez les nouveau-nés prématurés dès 25 SG (Martinerie et al., 2015), mais la production d'aldostérone reste faible jusqu'à 30 SG (Johnston et al., 2018). La concentration d'aldostérone augmente ensuite jusqu'au terme (Martinerie et al., 2015), en relation avec une néosynthèse fœtale (Ishimoto and Jaffe, 2011). Aucun dimorphisme sexuel n'a été démontré concernant les taux plasmatiques d'aldostérone chez le fœtus ou à la naissance (Abdel Mohsen et al., 2016; Laulhé et al., 2021).

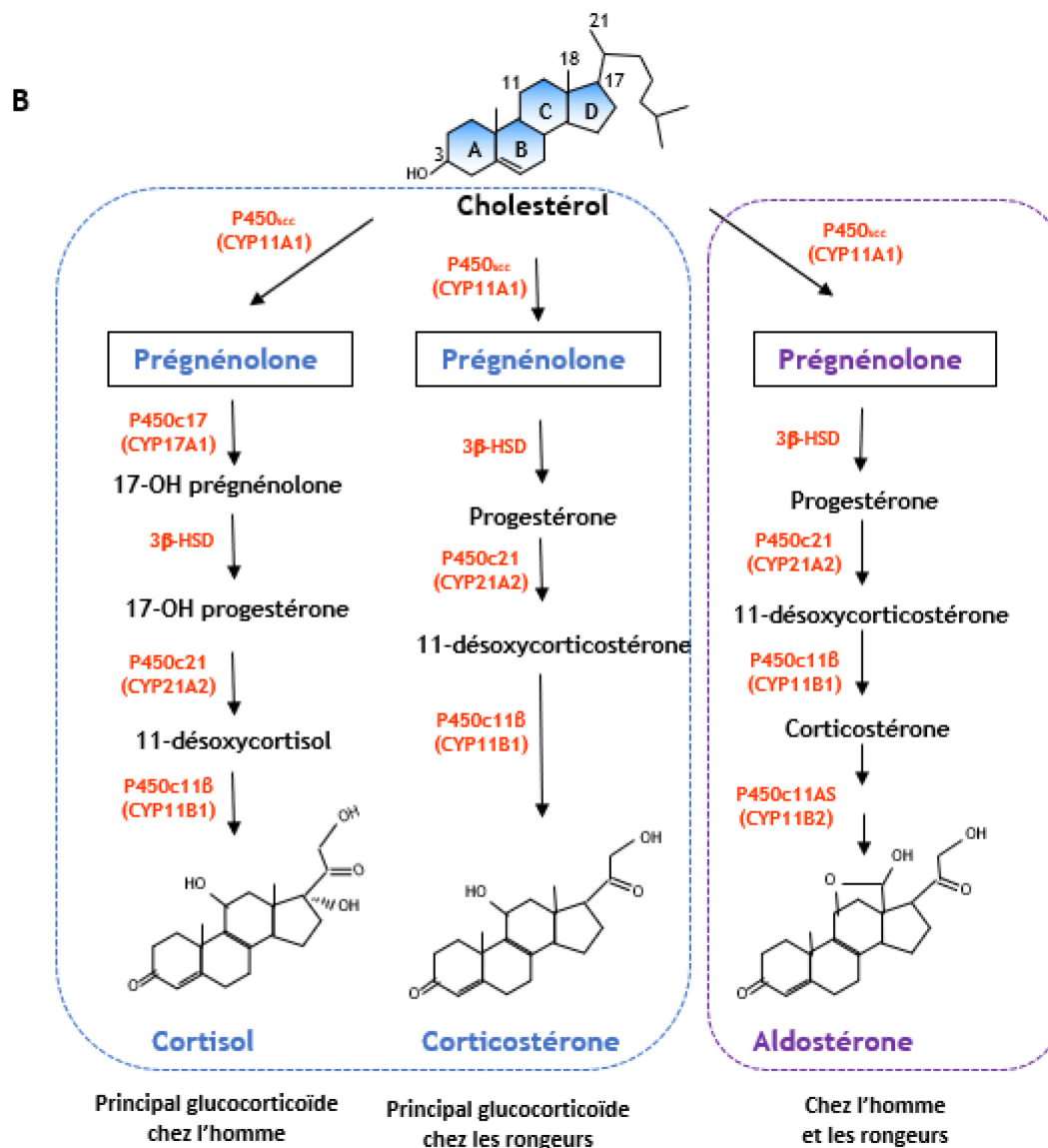
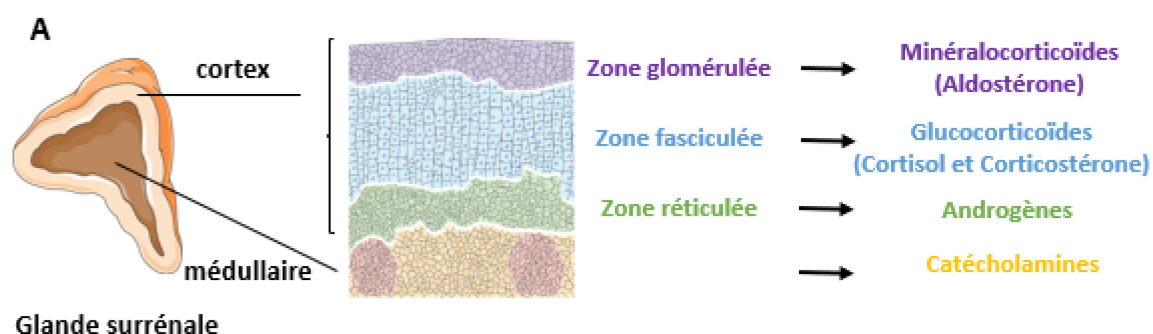


Figure 5 : La glande surrénale et la biosynthèse des hormones corticostéroïdes

- A. Glande surrénale
- B. Etape de la biosynthèse des hormones corticostéroïdes dans la zone glomérulée et fasciculée (D'après Connell et al., 2008)
- Les enzymes de la stéroïdogénèse sont indiquées en rouge*
- Le nom des gènes codant ces enzymes est indiqué entre parenthèses*

2.2. Régulation de la sécrétion d'aldostérone

La régulation de la sécrétion d'aldostérone peut être décomposée en deux phases : une première phase rapide, qui se met en place en quelques minutes à la suite d'un stimulus comme la baisse de la volémie ou l'augmentation de la kaliémie, et une seconde phase, plus lente, qui correspond à une phase dite chronique. La première phase repose sur le transport de cholestérol à la membrane interne mitochondriale contrôlée par la protéine StAR (Cherradi and Capponi, 1998). La seconde phase, qui se met en place après plusieurs heures, permet la sécrétion d'aldostérone grâce à la stimulation de l'expression de l'aldostérone synthase *CYP11B2* (Condon et al., 2002).

La sécrétion d'aldostérone dans le sang est régulée de façon circadienne par trois régulateurs principaux : le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA), l'hyperkaliémie et la adrénocorticotrophine ou ACTH (*AdrenoCorticoTrophic Hormone*) (Bollag, 2014; MacKenzie et al., 2019). Parmi les facteurs régulant la sécrétion d'aldostérone, le SRAA joue un rôle majeur en activant, de façon précoce, l'entrée de cholestérol dans la cellule et, de façon tardive, en permettant la synthèse de l'aldostérone synthase (*CYP11B2*), ce qui permet de majorer la synthèse d'aldostérone. Ce système est déclenché par plusieurs stimuli : soit à la suite d'une baisse de pression artérielle, détectée au niveau des artérioles afférentes du glomérule par des barorécepteurs, soit à la suite d'une baisse de la concentration de sodium dans le fluide luminal, détectée au niveau de la *macula densa*, soit à la suite d'une stimulation du récepteur β -adrénergique *via* l'activation du système nerveux sympathique au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire. Ces stimuli conduiront à la synthèse et à la sécrétion de rénine par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire puis à sa libération dans la circulation sanguine. Une fois sécrétée, la rénine hydrolyse l'angiotensinogène d'origine hépatique en angiotensine I, ce composé inactif est ensuite converti en angiotensine II par l'enzyme de conversion (ACE). L'angiotensine II agit au niveau de la zone glomérulée de la corticosurrénale, stimulant ainsi après plusieurs étapes, la sécrétion d'aldostérone. Chez l'homme adulte, cet effet est relayé par les récepteurs de l'Ang II de type I (AT1R), un récepteur couplé à une protéine G, situés à la membrane des cellules de la zone glomérulée de la corticosurrénale. La liaison de l'Ang II au récepteur AT1R couplé à la protéine G active la transduction du signal qui stimule la production d'aldostérone par plusieurs voies différentes tels que l'activation de la phospholipase C, augmentant ainsi le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) qui permet ensuite la mobilisation du calcium intracellulaire (Bassett et al., 2004), étape essentielle à l'activation de la calmoduline conduisant à l'augmentation la transcription du gène *CYP11B2* et/ou l'activité d'enzyme. Les autres voies de signalisation impliquées comprennent également la phospholipase D, les voies de la protéine kinase activée par des agents mitogènes, les tyrosine kinases, l'adénylate cyclase et la protéine kinase dépendante de l'AMPc (Bollag, 2014).

De plus, les variations de kaliémie et notamment l'hyperkaliémie extracellulaire induit une dépolarisation membranaire de la cellule corticosurrénale qui aboutit à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, et à la transcription du gène *CYP11B2* et de *StAR* (MacKenzie et al., 2019).

Enfin, l'ACTH, hormone sécrétée par l'hypophyse antérieure et appartenant à l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien régulant la synthèse de cortisol, peut également stimuler la sécrétion d'aldostérone de façon aiguë et transitoire, mais dans une moindre mesure que l'Ang II et l'hyperkaliémie. La liaison de l'ACTH à son récepteur, le récepteur de la mélanocortine 2 (MC2R), stimule l'expression de *StAR* via l'activation de l'adénylate cyclase (Clark, 2016).

En outre, la production des minéralocorticoïdes est également régulée de façon autocrine/paracrine par une grande variété de signaux bioactifs libérés à proximité des cellules corticosurrénales par les cellules chromaffines, les terminaisons nerveuses, les cellules du système immunitaire, les cellules endothéliales et les adipocytes (Lefebvre et al., 2019; Wils et al., 2020). Ces facteurs de régulation comprennent les neurotransmetteurs et les neuropeptides classiques tels que la sérotonine, la leptine, l'endothéline, l'oxyde nitrique, les catécholamines, le peptide natriurétique auriculaire, la substance P. Leur rôle physiologique dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone n'est pas entièrement compris, mais il est probable qu'ils participent à la régulation indépendante du SRAA des cellules de la zone glomérulée (Lefebvre et al., 2019).

3. Le Récepteur Minéralocorticoïde

3.1. Gènes, transcrits et protéine MR

La majorité des effets de l'aldostérone passent par l'intermédiaire de sa liaison à un récepteur intracellulaire, le Récepteur Minéralocorticoïde (MR), qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Le MR agit comme un facteur de régulation transcriptionnelle hormono-dépendant.

Structure du gène *NR3C2*

Le Récepteur Minéralocorticoïde (MR) est codé par gène *NR3C2* (*Nuclear Receptor sub-family 3 group C member 2*), localisé chez l'homme sur le bras chromosome 4 au niveau du locus 4q31.23 (Fan et al., 1989; Morrison et al., 1990). Ce gène est retrouvé sur le chromosome 8 chez la souris et sur le chromosome 19 chez le rat.

Le gène *NR3C2* est bien décrit chez l'homme, avec une taille approximative de 450 kilobases, et il est composé de dix exons séparés par huit introns (Zennaro et al., 1995). Les deux premiers exons 1 α et 1 β sont non-codants (**Figure 6**). Les exons 2 (1759 pb) et 9 (2733 pb) sont plus grands par rapport aux autres exons 1 α , 1 β , et exons 3 à 8 (taille inférieure 350 pb). En particulier, l'exon 2 possède le codon d'initiation (ATG) et l'exon 9 possède le codon stop de la traduction (TGA) ainsi que la séquence 3'-non traduite de l'ARNm qui est importante pour la régulation post-transcriptionnelle. Le gène *NR3C2* est contrôlé par deux promoteurs alternatifs, appelés P1 et P2, qui sont localisés dans la partie 5', en amont des exons 1 α , 1 β , respectivement. Ces promoteurs n'ont pas la même activité transcriptionnelle basale. Le promoteur P1 est transcriptionnellement actif dans la plupart des tissus cibles du MR alors que celle du promoteur P2 semble être restreinte à certains tissus ou à certains stades du développement (Le Menuet et al., 2000; Munier et al., 2010; Zennaro et al., 1996).

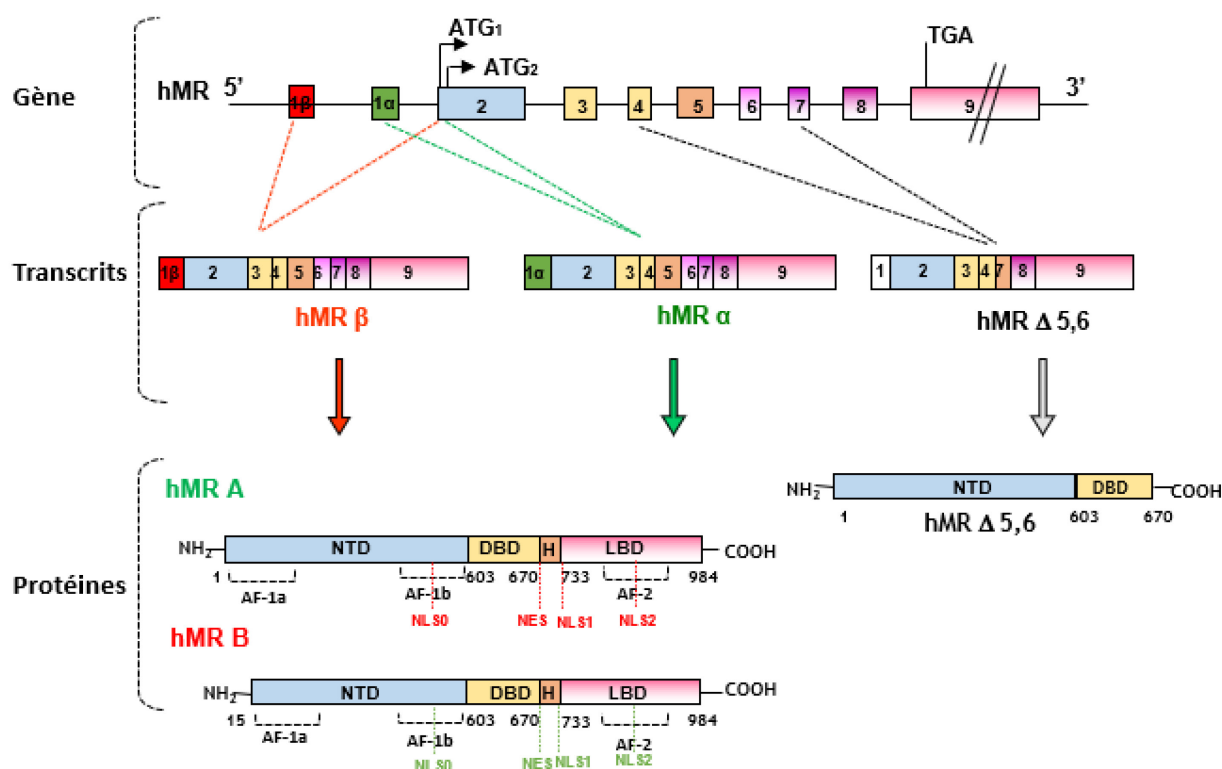


Figure 6 : Le récepteur minéralocorticoïde humain : le gène, les transcrits et les variants protéiques

(D'après Viengchareun et al., 2007)

hMR : récepteur minéralocorticoïde humain ; 1 α , 1 β et n° 2 à 9 : exons ; ATG : site d'initiation de la traduction, TGA : site de terminaison de la traduction ; NTD : domaine N-terminal ; DBD : domaine de liaison à l'ADN (*DNA Binding Domain*) ; LBD : Domaine de liaison au ligand (*Ligand Binding Domain*) ; H : région charnière ou *Hinge region* ; AF : Domain de transactivation ; NES : signal d'export nucléaire ; NLS : signal de localisation nucléaire.

Différents transcrits du MR

Il y a deux isoformes connues de l'ARNm du MR, hMR α et hMR β , qui sont générées à partir de deux exons différents 1 α et 1 β mais codent une seule protéine MR (Zennaro et al., 1997). Ces deux isoformes sont exprimées chez l'homme de façon identique dans les différents tissus exprimant le MR (région distale du néphron, entérocytes de la muqueuse colique...). Il semblerait que l'isoforme β soit davantage exprimée dans les glandes sudoripares (Zennaro et al., 1997). D'autres isoformes du MR ont été décrites comme l'isoforme hMR Δ 5-6 aboutissant à une protéine tronquée à l'extrémité C-terminale du domaine de liaison à l'ADN (LBD). En l'absence de LBD, ce variant protéique peut lier l'ADN, recruter des coactivateurs et a une capacité de transactivation ligand-indépendante (Zennaro et al., 2001).

Protéine MR

La protéine MR est constituée de 984 acides aminés (107 kDa) (Arriza et al., 1987). Il y a au moins deux variants protéiques : le variant hMR A et le variant hMR B. Leur structure est similaire aux autres récepteurs stéroïdiens avec 3 principaux domaines fonctionnels : le domaine N-terminal (NTD) ou domaine de transactivation, le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour *DNA Binding Domain*), la région charnière et le domaine de liaison au ligand (LBD pour *Ligand-Binding Domain*) (**Figure 6**) (Viengchareun et al., 2007).

Le NTD (602 acides aminés) contient deux domaines de transactivation, le domaine AF1a (AF pour *Activation Function*) (résidus 1-167) et AF1b (résidus 445-602). Ces domaines représentent un déterminant clé de la spécificité du MR, qui sont impliqués dans le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs modulant l'activité transcriptionnelle du récepteur. Il y a également un domaine inhibiteur central (résidus 163-437), qui se situe entre deux domaines de transactivation, capable de modifier la conformation des domaines AF1a et b et qui porte le signal de localisation nucléaire 0 (NLS₀) pour *Nuclear Localization Signal* (Pascual-Le Tallec et al., 2004).

Le DBD, une région extrêmement conservée entre les récepteurs stéroïdiens, présente une très grande importance fonctionnelle, en particulier pour la liaison du récepteur à l'ADN et pour sa dimérisation. Le DBD du MR est composé de 66 acides aminés (résidus 603-670) et possède une structure très spécifique, en doigt de zinc, qui permet de reconnaître facilement les éléments de réponse aux hormones (HRE) localisés sur la région régulatrice de gène cible. Entre les deux doigts de zinc, il existe une séquence de signal d'export nucléaire (NES) dont la mutation provoque la rétention nucléaire du

MR. A l'extrémité C-terminale du DBD, il y a également la séquence du signal de localisation nucléaire 1 (NLS1) (Pascual-Le Tallec and Lombès, 2005).

La région charnière, composée de 61 acides aminés, est peu conservée (résidus 671-732). Elle est impliquée dans le repliement de la protéine, favorisant l'interaction entre le NTD et le LBD, ainsi que la translocation du MR dans le noyau (Pascual-Le Tallec and Lombès, 2005).

Le LBD est un domaine de 251 acides aminés (résidus 732-984), qui porte de nombreuses fonctions : reconnaissance et interaction avec le ligand, interaction avec les protéines chaperonnes Hsp 70, Hsp 90 (*Heat shock Protein*), les coactivateurs et les corépresseurs ainsi que l'activité transactivatrice ligand-dépendante. Ce domaine du MR contient également le signal de localisation 2 (NLS2) (Pascual-Le Tallec and Lombès, 2005).

3.2. Sites d'expression du MR

Le MR est exprimé dans de multiples organes (**Figure 7**) et module diverses fonctions distinctes, non seulement dans le transport des électrolytes mais également d'autres fonctions comme l'inflammation ou le stress oxydatif... (Gomez-Sanchez et al., 2011). L'expression du MR a été initialement rapportée au niveau des tissus épithéliaux à jonctions serrées tels que le rein (Marver et al., 1974), le colon (Pressley and Funder, 1975). A présent, son expression a été rapportée non seulement dans des tissus épithéliaux mais aussi dans des tissus non épithéliaux comme le système nerveux central, le cœur, ou les tissus adipeux (Viengchareun et al., 2007). Le MR a initialement été identifié dans le rein, comme un récepteur sensible à l'aldostérone et dont l'activité et la liaison à l'aldostérone sont inhibées par la spironolactone, qui était définie comme antagoniste de ce récepteur (Marver et al., 1974). Le développement d'anticorps anti-MR permettra par la suite d'identifier les tissus exprimant le MR ainsi que la localisation subcellulaire du MR. Par ce moyen, l'expression du MR a été précisée dans les tissus épithéliaux polarisés à jonction serrées, cibles de l'aldostérone et siège d'un transport transépithélial de sodium. Sur des coupes de rein humain, le récepteur a été localisé précisément dans les tubules contournés distaux, l'anse de Henlé et les tubules collecteurs du cortex rénal (Hirasawa et al., 1999; Sasano et al., 1992). L'expression rénale du MR a été confirmée par la suite dans les parties distales du néphron (Lombes et al., 1990) puis élargie aux cellules mésangiales du glomérule (Nishiyama et al., 2005) et dans les podocytes (Shibata et al., 2007).

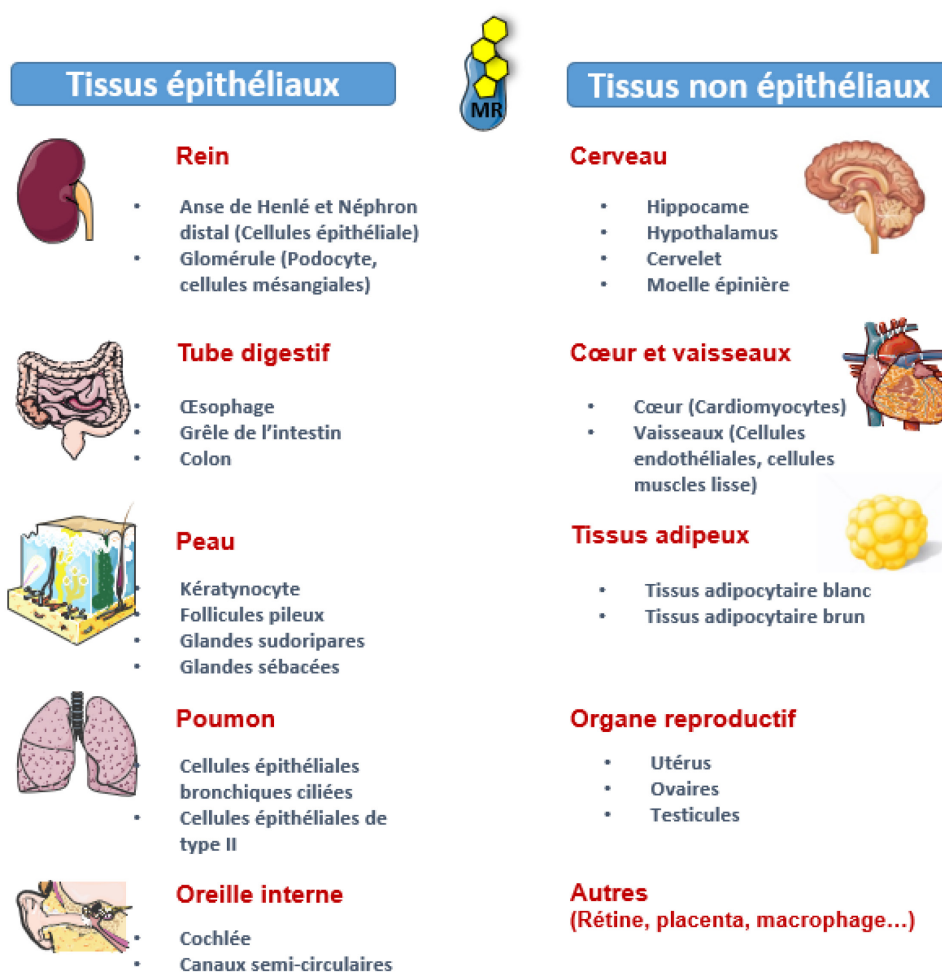


Figure 7 : Tissus exprimant le MR

L'expression du MR a ensuite été élargie à d'autres tissus épithéiaux. Le récepteur est exprimé dans plusieurs segments du tube digestif. A partir d'extraits de muqueuses intestinales de rat, l'affinité de l'aldostérone a été mesurée par des tests de liaison, ce qui a permis de révéler indirectement l'expression du MR dans les différentes parties de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et du colon (Pressley and Funder, 1975; Rafestin-Oblin et al., 1984). Grâce à un anticorps anti-AF1a du MR humain, les résultats précédents ont été confirmés par immunohistochimie et ont permis de montrer son expression dans l'épithélium œsophagien (Hirasawa et al., 1999). L'hybridation *in situ*, qui permet de détecter spécifiquement des transcrits dans des tissus grâce à des ribosondes complémentaires, a permis de révéler l'expression du MR dans la peau. En effet, le MR est exprimé dans les kératinocytes, les follicules pileux des glandes sudoripares et les glandes sébacées (Farman and Nguyen, 2016; Kenouch et al., 1994; Sevilla and Pérez, 2018). Ces observations ont été confirmées par immunohistochimie (Hirasawa et al., 1999). Enfin, le MR est aussi exprimé dans le poumon dans les canaux collecteurs des glandes trachéales et bronchiques, dans les cellules épithéliales bronchiques

ciliées et dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II, suggérant des rôles importants et inattendus pour les minéralocorticoïdes dans le poumon (Hirasawa et al., 1999; Keller-Wood et al., 2005; Krozowski and Funder, 1981; Suzuki et al., 2001). Dans ces tissus épithéliaux, l'expression du MR est associée à celle du Canal épithélial à sodium (ENaC pour *Epithelial Na⁺ Channel*), ce qui corrobore le rôle prépondérant du MR dans la régulation de l'homéostasie hydrosodée. L'expression du MR a aussi été montrée dans l'oreille interne (cochlée et canaux semi-circulaires) où il pourrait contrôler l'équilibre hydroélectrolytique de l'endolymphe (Pitovski et al., 1993; Teixeira et al., 2006).

Le MR est également exprimé dans des tissus non-épithéliaux. Le développement d'un anticorps anti-idiotypique du MR a permis de confirmer son expression dans les cardiomyocytes, dans les cellules endothéliales des gros vaisseaux sanguins tels que l'aorte (Lombès et al., 1992), ainsi que dans les cellules muscles lisses (Gomez-Sanchez et al., 2011; Jaffe and Mendelsohn, 2005). Des tests de liaison avec l'aldostérone ont par ailleurs permis de montrer que le foie est aussi un tissu cible de l'aldostérone (Duval and Funder, 1974; Schreier et al., 2018). L'expression du MR a été mise en évidence par hybridation *in situ*, dans l'hippocampe, qui joue un rôle essentiel dans la mémoire (Van Eekelen et al., 1988), et dans l'hypothalamus, siège du contrôle de l'appétit sodée (van Eekelen et al., 1991). Dans le cerveau, la protéine MR a été retrouvée aussi dans l'hypothalamus, le cervelet et la moelle épinière (Gomez-Sanchez et al., 2011) contrôlant non seulement la balance hydrosodée mais aussi le comportement en réponse au stress (de Kloet and Joëls, 2017; Kanatsou et al., 2019). Enfin, son expression a été confirmée dans la rétine (Daruich et al., 2015; Mirshahi et al., 1997; Zhao et al., 2019), le placenta (Hirasawa et al., 1999), les macrophages (Fraccarollo et al., 2019; Rickard et al., 2009), les lymphocytes T (Sun et al., 2017), les tissus adipeux blanc et brun (Caprio et al., 2007; Zennaro et al., 1998). Enfin, grâce à deux modèles de souris transgéniques exprimant l'Antigène de T de SV40 sous le contrôle du promoteur proximal P1 ou du distal P2 du gène *NR3C2* (souris P1.TAg et P2.TAg), le transcrite du MR a été détecté dans l'utérus, les ovaires et les testicules (Le Menuet et al., 2000). Récemment, le MR a été détecté dans les cellules de Leydig stimulant la production de testostérone (Wang et al., 2019) ou dans les glandes endométriales jouant un rôle bénéfique pour la décidualisation humaine (Li et al., 2020).

3.3. Expression biphasique du MR au cours du développement rénal

Chez l'Homme, les nouveau-nés à terme présentent, physiologiquement, une résistance partielle à l'aldostérone, qui survient au cours de la première semaine de vie, avec une perte urinaire d'eau et de sodium (Holtbäck and Aperia, 2003). En effet, il a été montré, sur une cohorte de 48 nouveau-nés à terme, que l'aldostérone plasmatique mesurée dans le sang de cordon était plus élevée chez les

nouveau-nés que chez leur mère (Martinerie et al., 2009a). Ces enfants présentaient sur leur ionogramme un profil compatible avec un pseudohypoaldostéronisme à savoir une hyponatrémie et une hyperkaliémie relative. De plus, l'aldostérone urinaire n'était pas corrélée au rapport Na^+/K^+ urinaire, témoignant de l'absence de sensibilité de la voie minéralocorticoïde rénale à l'aldostérone chez le nouveau-né à terme. Ce tableau clinique a pu être expliqué par l'étude de l'ontogenèse des différents acteurs de la voie de signalisation minéralocorticoïde. En effet, Martinerie *et al* ont montré que l'expression rénale du transcrite et de la protéine MR est très faible à la naissance chez l'homme et la souris, après une expression transitoire de son ARNm entre le 16^e et le 18^e jour de gestation chez la souris, et la 15^{ème} et 24^{ème} semaine d'aménorrhée (SA) chez la femme (Martinerie et al., 2009b). L'expression du MR augmente ensuite en période post-natale à 8 jours de vie chez la souris et durant les premiers mois de vie chez l'homme. Les mécanismes responsables de la diminution d'expression du MR à la naissance ne sont pas élucidés à ce jour. Toutefois, il a été montré que les variations d'expression du MR en période néonatale n'étaient pas régulées par l'aldostérone grâce à un modèle d'inactivation de l'aldostérone synthase chez la souris (Martinerie et al., 2011). Un profil d'expression similaire a été retrouvé pour la sous-unité α du canal ENaC et pour l'enzyme 11 β HSD2 (Martinerie et al., 2009b), ce qui suggère une faible expression et fonctionnalité de l'ensemble de la voie minéralocorticoïde à la naissance.

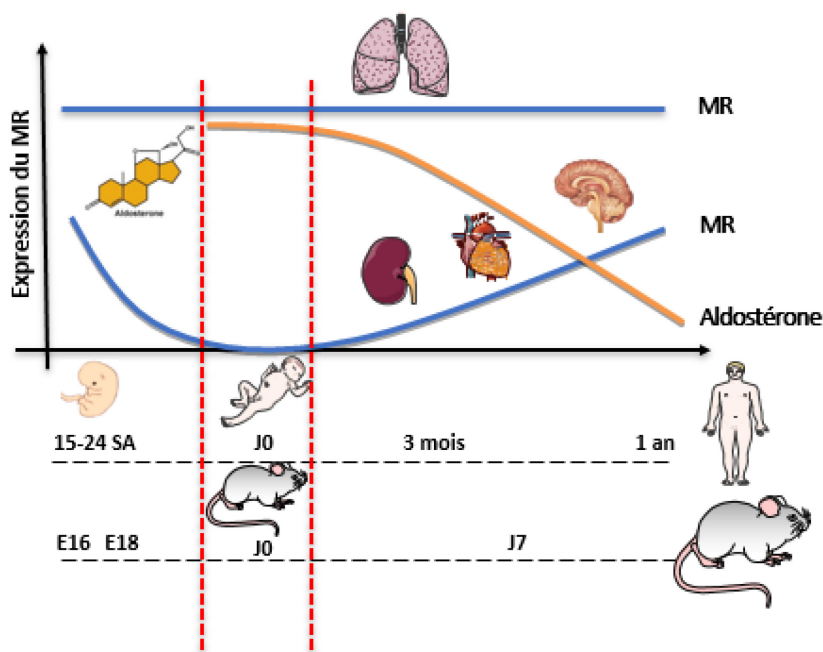


Figure 8 : Expression biphasique du MR au cours du développement rénal

(D'après Martinerie et al., 2013)

Il est intéressant de noter que ce profil d'expression est extrêmement bien conservé entre l'homme et la souris, suggérant un rôle important en physiologie de cette fenêtré où le MR n'est pas exprimé. De plus, alors que l'expression rénale du MR est également réprimée à la naissance après une phase d'expression transitoire (**Figure 8**), ceci est aussi vrai dans les autres tissus cibles du MR tels que le cerveau ou le cœur, à l'inverse, l'expression du MR est maintenue en période néonatale dans le poumon (Martinerie et al., 2013), suggérant un rôle physiologique important. La voie de signalisation minéralocorticoïde pourrait être impliquée dans la résorption du liquide pulmonaire à la naissance. La surcharge hydrique liée à la résorption du liquide pulmonaire pourrait ensuite être éliminée par le rein, dans lequel l'expression et la fonctionnalité des différents transporteurs tubulaires de la voie minéralocorticoïde faisaient défaut en période néonatale.

3.4. Mécanismes d'action du MR

3.4.1. Voie génomique

Dans ce chapitre, nous aborderons d'abord la voie génomique par laquelle, le complexe aldostérone/MR migre dans le noyau et se fixe sur des séquences régulatrices pour stimuler la transcription des gènes cibles. Ce mécanisme d'action du MR dans une cellule rénale polarisée du tubule collecteur est présenté sur **la Figure 9**.

Activation du MR et translocation nucléaire

A l'état basal, le MR est localisé majoritairement dans le compartiment cytoplasmique, lié à des protéines chaperonnes. Cette liaison permet de maintenir le récepteur dans une conformation optimale pour la liaison avec son ligand (Jaglaquier et al., 1996) et pour le protéger contre la dégradation par le protéasome (Faresse et al., 2010). Ces protéines chaperonnes forment un complexe multiprotéique incluant les protéines de choc thermique Hsp 70 et Hsp 90 (*Heat Shock Protein*), et les immunophilines telles que FKBP51 et FKBP52 (*FK506 Binding Protein*) (Bruner et al., 1997), qui jouent un rôle de modulation de l'affinité du MR avec son ligand (Huyet et al., 2012). La liaison d'un ligand agoniste comme l'aldostérone ou le cortisol, entraîne un changement de conformation du MR, notamment une compaction du LBD avec un repliement de l'hélice H12 sur la cavité de liaison. Cette liaison permet la dissociation des protéines chaperonnes et la migration du complexe ligand-MR dans le noyau par les protéines de transport importine α et β (Nishi and Kawata, 2007).

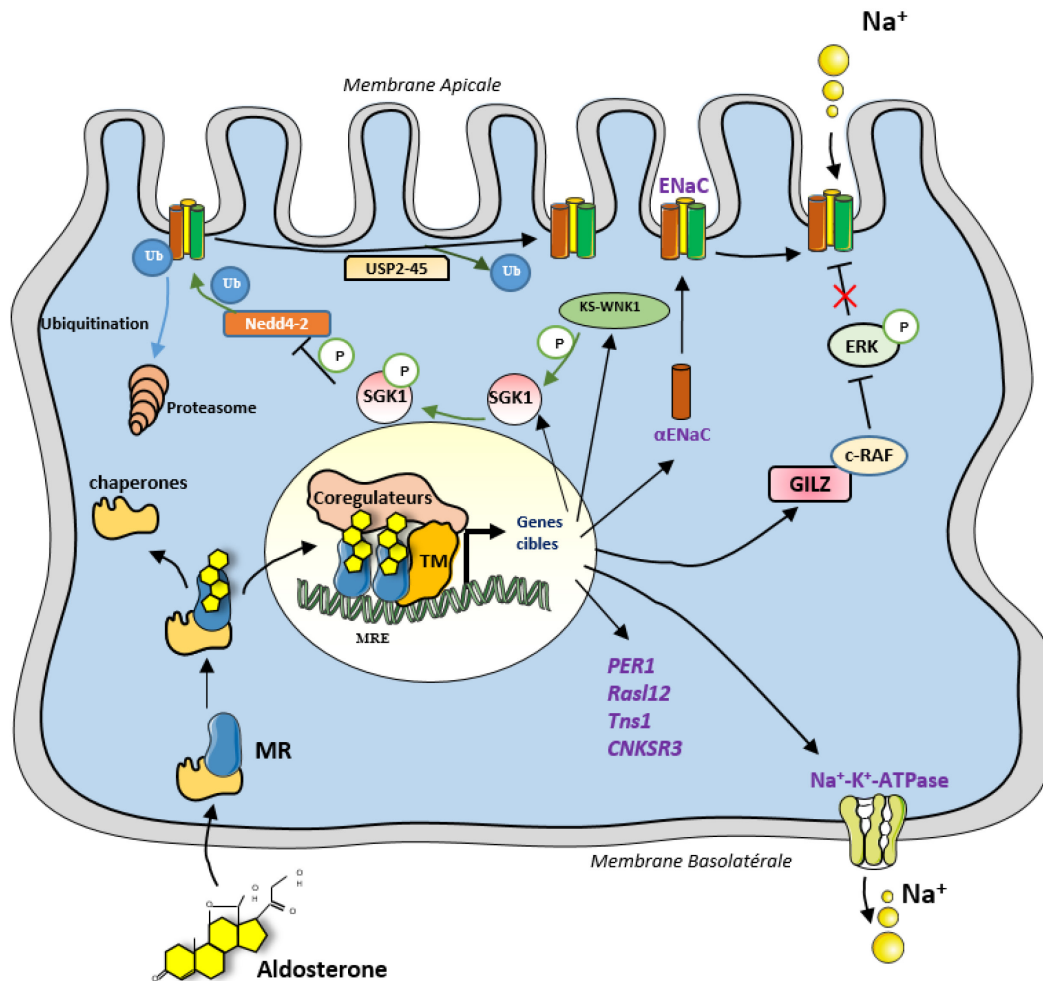


Figure 9 : Mécanisme d'action du MR

(Adapté selon Viengchareun et al., 2021)

Interaction du MR avec l'ADN

Après avoir migré dans le noyau, le complexe ligand/MR se dimérise et se lie sur des séquences spécifiques appelées MBS (*Mineralocorticoid Binding Sites*) pour « sites de liaison du MR » localisées dans les promoteurs des gènes cibles du MR (Le Billan et al., 2015; Lombès et al., 1993). De nombreuses études ont montré que le MR est capable de former un hétérodimère avec le Récepteur Glucocorticoïde (GR) dans les cellules coexprimant ces deux récepteurs, permettant de moduler leur activité transcriptionnelle propre (Kiilerich et al., 2015; Pooley et al., 2020; Rivers et al., 2019; Trapp et al., 1994). Grâce à une stratégie couplant immunoprécipitation de la chromatine et séquençage haut débit (ChIP-seq), Le Billan et al ont mis en évidence, dans une lignée de cellules rénales humaines stimulées par l'aldostérone, l'existence de près de mille MBS dont la majorité n'était ni un GRE (*Glucocorticoid Reponse Element*) ni un MRE (*Mineralocorticoid Reponse Element*) mais des sites de liaison à d'autres facteurs de transcription (FOX, EGR1, AP1, PAX5...), indiquant que le MR est capable

de stimuler l'expression de gènes cibles par interconnexion ou *tethering*, indépendamment des séquences HRE (*Hormone Response Element*) (Le Billan et al., 2015). Les analyses bio-informatiques ont permis de caractériser ce motif consensus spécifique du MR, appelé MRE (*Mineralocorticoid Response Element*). Ce motif MRE est constitué d'une séquence palindromique de 15 bases composée de deux hémi-sites séparés par trois bases nucléotidiques. La comparaison des différents MRE identifiés a mis en évidence que le motif xGxACx dans chaque hémi-site est le plus conservé. Les séquences régulatrices MBS comportent soit un motif MRE complet, soit un hémi-site, soit une combinaison d'un MRE complet avec un ou plusieurs hémi-sites (Le Billan et al., 2015). En outre, le MR peut se lier à l'ADN après hétéro-dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires comme le GR (Récepteur Glucocorticoïde), le ER (Récepteurs des œstrogènes), le AR (Récepteur des androgènes) (Jiménez-Panizo et al., 2019; Le Billan et al., 2018), ce qui permet de moduler finement l'activité transcriptionnelle.

Recrutement des corégulateurs transcriptionnels

Une fois fixé, le complexe MR/Aldostérone permet d'initier le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et des corégulateurs, activant (coactivateur) ou réprimant (corépresseur) ainsi la transcription des gènes cibles. Les corégulateurs interagissent majoritairement avec le LBD du MR au niveau du site AF2, mais aussi avec le NTD au niveau des domaines de transactivation AF1a ou AF1b grâce à leur motifs riches en leucine LXXLL (L : Leucine ; X : autres acides aminés) (Fuller et al., 2017). Les corégulateurs associés au MR sont impliqués dans diverses fonctions : ouverture de la chromatine par modification de l'acétylation des histones directement ou indirectement par recrutement d'histone acétyltransférases (HAT), recrutement de l'ARN polymérase de type II ou blocage de l'accès aux sites d'initiation de la transcription. Leur action est à la fois dépendante du tissu, de l'état de la cellule et de la chromatine, de la nature du ligand lié au MR et du locus du gène régulé. Le **Tableau 1** présente la liste des corégulateurs connus pour interagir avec le MR (d'après Fuller et al., 2019).

Type de corégulateurs	Nom	Site d'interaction avec le MR	Fonctions connues
Coactivateurs	SRC-1	AF-2; AF-1 par 1 ^{er} isoforme	Recrute le complexe d'acétylation des histones pour initier la transcription ; faible activité intrinsèque d'histone acétyltransférase.
	SRC-2, TIF2, GRIP1	AF-1, AF-2	Renforce la transactivation
	P300/CBC	AF-1, AF-2	Exerce une activité d'histone acétyltransférase ; recrute l'ARN polymérase II au promoteur du gène cible.
	PGC-1 α	AF-2	Recrute le complexe d'histone acétyltransférase ; facilite la liaison de récepteur nucléaire au complexe d'initiation de la transcription.
	ELL	AF-1b	Facteur d'élongation de l'ARN polymérase II ; empêche l'arrêt prématuré et la pause transitoire de la polymérase II
	FLASH	AF-1	Régule l'apoptose cellulaire
	FAF-1	AF-1	Régule l'apoptose cellulaire
	Ubc9	NTD	enzyme conjuguant SUMO E2 ; forme un complexe de coactivation avec SRC-1
	TIF1 α	NTD	Coactivateur/corépresseur transcriptionnel
	RIP140	NTD	Coactivateur NR
	Tesmin	LBD	Coactivateur spécifique d'un ligand
	EEF1A1	ND	Croissance et prolifération
	XRCC6	ND	Réparation de l'ADN
	RACK1	ND	Regulation Protéine kinase C
Corepresseurs	SMRT	LBD	Recrute l'histone désacétylase
	NcoR	LBD	Recrute l'histone désacétylase
	DAXX	NTD	Régule l'apoptose cellulaire ; réprime la transactivation du MR dans certaines lignées cellulaires.
	PIAS1	NTD ? LBD	SUMO E3 ligase ; le mécanisme exact de l'action répressive n'est pas clair.
	NF-YC	AF-1	Inhibe l'interaction N-C du MR induite par l'aldostérone.
	Germin4	? LBD	Organelle nucléaire associée
	SSRP1	ND	?

Tableau 1 : Récapitulation des corégulateurs connus interagissant avec le MR

(D'après Fuller et al., 2019)

AF : activation function, CBP : cAMP response element binding protein-binding protein, DAXX : death-associated protein, DBD : DNA-binding domain, ELL : eleven-nineteen lysine-rich leukemia, FLASH : Fas-associated death domain-like IL-1 β -converting enzyme-associated huge, FAF-1 : Fas-associated factor 1, GRIP1 : glucocorticoid receptor-interacting protein 1, LBD : ligand binding domain, MR : mineralocorticoid receptor, NCoR : nuclear receptor corepressor, ND : non déterminé, NF-YC : Nuclear transcription factor Y subunit gamma, NTD : N-terminal domain, p300/CBP : p300 and CREB Binding Protein coactivators, PGC1 : peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator 1, PIAS : protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription, RACK1 : receptor for activated C kinase-1, RHA : RNA helicase A, RIP140 : receptor interacting protein 140, SMRT : silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor, SRC-1 : steroid receptor coactivator 1, SUMO-1 : small ubiquitin-related modifier-1, Tesmin : Testis expressed Metallothionein like protein, TIF1 α : transcriptional intermediary factor 1 α , TIF2 : transcriptional intermediary factor 2, Ubc9 : ubiquitin-like protein SUMO-1 conjugating enzyme, Gemin4 : nuclear organelle-associated protein 4, EEF1A1 : eukaryotic elongation factor 1A1, SSRP1 : structure-specific recognition protein 1, XRCC6 : X-ray repair cross-complementing protein 6.

Les gènes cibles du MR impliqués dans la réabsorption de sodium

La plupart de ces gènes cibles codent des protéines impliquées dans le transport de sodium depuis la lumière du tubule vers le milieu interstitiel, notamment la sous-unité α du Canal Epithélial à sodium (α ENaC) (Loffing and Schild, 2005; Masilamani et al., 1999), localisée à la membrane apicale ou encore la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, localisée à la membrane basolatérale (Verrey, 1995). Depuis, d'autres gènes cibles, précocement induits par l'aldostérone, ont été identifiés : il s'agit des gènes codant les kinases *Sgk 1* (*Serum and glucocorticoid-related kinase 1*) (Náray-Fejes-Tóth et al., 1999; Pearce, 2001) et *WNK1* (*With No lysine 1*) (Náray-Fejes-Tóth et al., 2004) ou encore le facteur de transcription *GILZ* (*Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper protein*) (Ueda et al., 2014).

Plus récemment, notre équipe a pu identifier de nouveaux gènes cibles du MR, dont la transcription est induite par l'aldostérone selon une dynamique de recrutement bien précise permettant de classer les gènes cibles comme précoces (*PER1*, *period circadian clock 1*), intermédiaires (*FKBP5*, *FK506 Binding Protein*) et tardifs (*ZBTB16*, *zinc finger and BTB domain containing 16*) en fonction de la cinétique rapide, intermédiaire ou tardive de l'activation de la transcription du gène correspondant. Ces nouveaux gènes cibles, dont la fonction sur la signalisation minéralocorticoïde n'a pas été encore bien définie, constituent de nouvelles pistes dans la compréhension du rôle joué par le MR dans le contrôle hormonal du transport ionique (Le Billan et al., 2018, 2015).

La sous-unité α du canal épithélial à sodium (*SCNN1A*)

Le canal épithélial à sodium ENaC est une protéine transmembranaire perméable au sodium, appartenant à la famille des canaux ioniques ENaC/dégénérine. Ce canal est exprimé au niveau des segments néphroniques sensibles à l'aldostérone au niveau de la membrane apicale des cellules tubulaires principales permettant la réabsorption transépithéliale de sodium de la lumière tubulaire vers le milieu intérieur (Duc et al., 1994). Il est constitué de trois sous-unités, appelées α , β , γ (Canessa et al., 1994), et codées respectivement par les gènes *SCNN1A* (sur chromosome 12, au locus 12p13 chez l'homme et sur le chromosome 6 chez la souris), *SCNN1B* et *SCNN1G* (sur le chromosome 16 au locus 16p12.1 et 16P12.2 et sur le chromosome 7 chez la souris), qui dérivent d'un gène ancestral commun et qui partagent 35 % d'homologie de séquence (Rossier et al., 2002). Dans les parties distales du néphron, l'aldostérone active la transcription de la sous-unité α du canal mais pas celles des sous-unités β et γ (Masilamani et al., 1999). Ceci n'est pas vrai dans le colon où l'aldostérone stimule la transcription de la sous-unité β (Garty and Palmer, 1997; Palmer and Schnermann, 2015).

La pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

La pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est le second principal acteur de l'équilibre hydrosodée dans le rein. Cette protéine transmembranaire appartient à la famille des P-ATPases qui regroupe de nombreux transporteurs actifs capables de s'autophosphoryler et d'utiliser l'ATP comme source d'énergie (Chan et al., 2010). Elle est composée de deux sous-unités α et β . Chaque sous-unité possède 4 isoformes ayant des spécificités fonctionnelles et tissulaires différentes (Maeda et al., 1998). L'isoforme $\alpha 1\beta 1$ est majoritaire et exprimée au niveau du rein. L'aldostérone induit l'adressage de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ à la membrane basolatérale en moins de 3 h (Summa et al., 2001). Cet effet est induit par la fixation du complexe aldostérone/MR sur des éléments MRE/GRE identifiés dans le promoteur du gène *ATP1A1* (Kolla et al., 1999). Cette pompe permet d'extruder vers le milieu intérieur le sodium intracellulaire qui a été accumulé par le canal ENaC.

La kinase *Sgk1*

Le gène *SGK1* (*Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*), qui code la sérine thréonine kinase, est localisé sur le chromosome 6 au locus q23.2 chez l'homme. Cette kinase a été identifiée dans le génome de diverses espèces et est hautement conservée au cours de l'évolution. Son expression chez l'homme est ubiquitaire (Lou et al., 2016). L'expression de *SGK1* est faible en condition physiologique dans la plupart de tissus. Son expression et son activité sont régulées par l'aldostérone et le cortisol. La transcription du gène *SGK1* est précocement induite par l'aldostérone, dès 30 min, *via* le MR qui se lie sur un GRE localisé dans le promoteur du gène (Náray-Fejes-Tóth et al., 1999; Raikwar and Thomas, 2017). L'augmentation de la transcription de *SGK1* entraîne un maintien du canal ENaC à la membrane apicale, favorisant ainsi la réabsorption de sodium (Pearce, 2001). Le rôle régulateur de *SGK1* sur l'expression et l'activité de l'ENaC repose sur plusieurs mécanismes. L'expression d'ENaC est maintenue à la membrane apicale, par inhibition de son mécanisme de dégradation et de recyclage dépendant de la protéine Nedd4-2 (*Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated protein*). La protéine Nedd4-2 est une Ubiquitine ligase E3 qui peut greffer des groupements ubiquitine sur les différentes sous-unités d'ENaC et entraîne leur dégradation dans le protéasome (Staub et al., 2000). Dans un modèle de cellules du canal collecteur cortical (CCD), un traitement par l'aldostérone augmente la phosphorylation de Nedd4-2 par *SGK1*, au niveau des sérine 338 et 444 (Debonneville et al., 2001). Cette phosphorylation entraîne le recrutement de la protéine 14-3-3 dimérisée (Bhalla et al., 2005), inhibant l'interaction de Nedd4-2 avec ENaC et réduisant sa dégradation. De plus, *SGK1* augmente l'expression d'ENaC à la membrane apicale après phosphorylation de la protéine AS160 (Akt/PKB substrate of 160 kDa), complexe qui stabilise ENaC dans le compartiment intracellulaire à l'état basal dans une lignée cellulaire murine de CCD (Liang et al., 2010). En parallèle, *SGK1* active la

protéase activatrice de canaux CAP1 (appelée aussi prostasine) (Rotin, 2000), qui est ancrée à la membrane plasmique où elle est elle-même nécessaire au maintien de l'activité du canal ENaC (Vallet et al., 1997). Enfin, il a été montré que *SGK1* augmente l'activité et la probabilité d'ouverture du canal ENaC comme l'ont montré les expériences réalisées dans des oocytes de xénope et sur une lignée cellulaire murine de CCD (Diakov and Korbmacher, 2004).

La kinase WNK1

WNK1 ou *With No Lysine kinase 1* est un gène induit par le complexe aldostérone-MR dans le rein (Náray-Fejes-Tóth et al., 2004). Le rôle de cette sérine/thréonine kinase dans le rein a initialement été identifié à la suite de la découverte d'une mutation activatrice dans le gène *WNK1* chez des patients atteints d'hypertension artérielle associée à un pseudohypoaldostéronisme de type II (Wilson et al., 2001). *WNK1* est fortement exprimée dans le cytoplasme des cellules du néphron distal. Il y a deux isoformes : l'isoforme longue *WNK1* et une forme courte, appelée *KS-WNK1*, qui est exprimée spécifiquement dans le rein (*KS* pour *Kidney Specific*). L'expression de *KS-WNK1* est induite rapidement en 30 min par l'aldostérone *via* le MR (Náray-Fejes-Tóth et al., 2004). Il a été démontré que *KS-WNK1* augmente significativement la réabsorption de sodium sur des modèles de cellules rénales polarisées. Cette kinase active le co-transporteur de Na^+/Cl^- , appelé *NCC*, qui est un partenaire indispensable d'ENaC pour la réabsorption de sodium au niveau de la membrane apicale. Enfin, il a été montré que la kinase *SGK1*, induite par l'aldostérone, permettrait le maintien de la protéine *KS-WNK1* et de son activité, en inhibant l'ubiquitine ligase *Nedd4-2* dont *KS-WNK1* est une des cibles (Roy et al., 2015).

Le facteur de transcription GILZ

GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine zipper protein*) est un des gènes précoces induits par l'aldostérone. C'est un facteur de transcription appartenant à la famille des *TSC22* (*Transformation growth factor- β -Stimulated Clone 22*) qui ont un rôle très divers dans l'homéostasie cellulaire et la régulation du système immunitaire (Pépin et al., 2015). *GILZ* est issu de la transcription du gène *TSC22D3*, localisé sur le chromosome X au niveau du locus Xq22.3. Dans les cellules rénales, il y a 4 isoformes issues d'un épissage alternatif de *TSC22D3* aboutissant à la traduction de 4 variants protéiques jouant des rôles distincts dans la régulation de fonction cellulaires clés, notamment la prolifération et le transport ionique (Soundararajan et al., 2007). Selon les travaux de l'équipe de David Pearce, *GILZ* permet l'expression d'ENaC à la surface cellulaire et d'engendrer un courant transépithélial de sodium, par l'interaction direct avec *c-Raf* et l'inhibition de la phosphorylation d'*ERK* (Soundararajan et al., 2007, 2005). A l'état basal, *ERK* activé induit la phosphorylation de ENaC, entraînant sa reconnaissance par l'ubiquitine ligase *Nedd4-2* et son internalisation (Shi et al., 2002; Yang et al., 2006). Il a été également démontré que *GILZ* stimule le transport de sodium *via* ENaC en

préservant la localisation subcellulaire de SGK1 (Soundararajan et al., 2010). Récemment, il a été montré que GILZ est essentiel à l'excrétion de potassium par le rein. En inhibant le transporteur NCC, GILZ favorise l'excrétion de sodium, ce qui augmente à la fois la réabsorption de sodium par ENaC et par l'équilibre du potentiel électrochimique transmembranaire, augmente l'excrétion du potassium par le canal potassique ROMK (*Renal Outer Medullary K channel*) (Rashmi et al., 2017).

Autres gènes cibles du MR

D'autres cibles précoces de l'aldostérone et du MR ont été identifiées après microdissection de tubules distaux chez la souris (Fakitsas et al., 2007) ou chez le rat (Boulkroun et al., 2002). Il s'agit de Grem2 (*protein related to DAN and cerebrus* (PRDC)) (un gène important dans la modulation de l'homéostasie par la voie de la protéine morphogénétique osseuse-2), du facteur de transcription activateur 3 (ATF3) (un facteur sensible au stress appartenant à la famille des facteurs de transcription de la protéine activatrice 1 (AP1)), le modulateur de l'élément sensible à l'AMPc (CREM) et la protéase spécifique de l'ubiquitine Usp2-45. Notamment, l'isoforme 45 du gène *USP2* (*Ubiquitin Specific Peptidase 2*) qui déubiquityle ENaC et stimule le transport de sodium relayé par ENaC. Cependant, cet effet est indépendant à celui de Sgk1 (Fakitsas et al., 2007). Le Billan *et al.* ont identifié l'isoforme Usp2 variant 3 comme cible de l'aldostérone qui est spécifiquement inhibée par la finérénone et pas par la spironolactone (Le Billan et al., 2021). NDRG2 (N-myc downstream regulated gene 2) est aussi un gène précocement induit par l'aldostérone dans le rein et le colon distal chez le rat (Boulkroun et al., 2002).

En réalisant des analyses de CHIP-Seq et de microarrays sur des cellules distales surexprimant un hMR-taggé (3xFlag), Ueda *et al.* ont confirmé que Rasl12, Tns1 sont également des cibles directes du MR après 1 h de traitement avec 10^{-7} M d'aldostérone (Ueda et al., 2014). Tns1 est une phosphoprotéine associée à une adhérence focale et à la migration cellulaire par la liaison à la F-actine (Chen et al., 2002), enrichie dans les reins normaux, qui contribue à l'adhérence cellulaire et au maintien de la polarité cellulaire dans les tubules distaux (Ueda et al., 2014). Rasl12 est un membre des protéines de la famille Ras mais son rôle reste inconnu (Ueda et al., 2014).

Le gène CNKSR3 (*Connector enhancer of kinase suppressor of ras 3*) est également une cible directe du MR (Ziera et al., 2009). La protéine CNKSR3, un homologue des protéines d'échafaudage, est impliquée dans la régulation de la voie MAPK. Elle est exprimée fortement dans les cellules du tubule collecteur cortical, et est impliquée dans le maintien du transport de sodium relayé par ENaC (Ziera et al., 2009).

De plus, le gène *PER1* (*PERiod circadian protein homolog 1*) a été identifié comme un gène cible direct du MR dans le rein (Le Billan et al., 2015; Mészáros et al., 2014). Ce facteur de transcription est un des acteurs majeurs de l'horloge circadienne intracellulaire périphérique, notamment dans le rein (Mészáros et al., 2014).

Enfin, l'aldostérone et le MR induisent également un grand nombre de gènes non impliqués de façon directe dans la régulation de sodium mais favorisant l'inflammation et la fibrose et stimulant la prolifération cellulaire comme NF- κ B (Leroy et al., 2009).

Dualité entre les voies minéralocorticoïde et glucocorticoïde rénale et mécanismes de sélectivité du MR

Il existe une dualité entre les voies minéralocorticoïde et glucocorticoïde (**Figure 10A**). Tout d'abord parce que, l'aldostérone et le cortisol ont une structure proche, c'est pourquoi le MR possède la même affinité pour ces deux ligands, mesurée par leur constante de dissociation (K_d) avec ces deux hormones (Arriza et al., 1987; Hellal-Levy et al., 1999). Le GR a aussi une affinité équivalente pour ces deux hormones. Ensuite, parce que le MR et le GR ont une forte homologie de séquence et de structure, se traduisant notamment par leur capacité à reconnaître des GRE/MRE quasi-identiques. Ainsi, ces deux voies de signalisation peuvent stimuler le transport de sodium dans le rein, mais probablement dans différents contextes ou stades de développement.

Ainsi, le MR peut être activé par son ligand principal, l'aldostérone mais aussi par le cortisol (la corticostérone chez les rongeurs) dont la concentration plasmatique peut être jusqu'à 1000 fois supérieure chez l'homme en condition physiologique (Farman and Rafestin-Oblin, 2001). Il existe alors plusieurs mécanismes permettant à l'aldostérone d'activer sélectivement le MR.

Le premier niveau, appelé niveau « pré-récepteur », repose essentiellement sur l'action de l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β HSD2) (**Figure 10B**). Cette enzyme est exprimée dans la plupart des tissus cibles du MR, en particulier dans le rein, au niveau du tubule distal et du canal collecteur cortical. En présence de NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), elle transforme le cortisol actif (Composé F) en cortisone (Composé E) chez l'homme ou la corticostérone (Composé B), chez le rongeur, en 11-déshydro-corticostérone (Composé A). Cette transformation enzymatique rend ces composés E et A inactifs puisqu'ils ne peuvent plus lier le MR (Edwards et al., 1988; Funder et al., 1988). A l'inverse, dans les tissus cibles non-épithéliaux du MR, tels que les tissus adipeux, l'expression de la 11 β HSD2 n'est pas exprimée. Dans ces tissus, c'est la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 β HSD1) qui régénère la cortisone en cortisol, suggérant que dans ces tissus, le cortisol constitue le premier ligand physiologique du MR (Draper and Stewart, 2005).

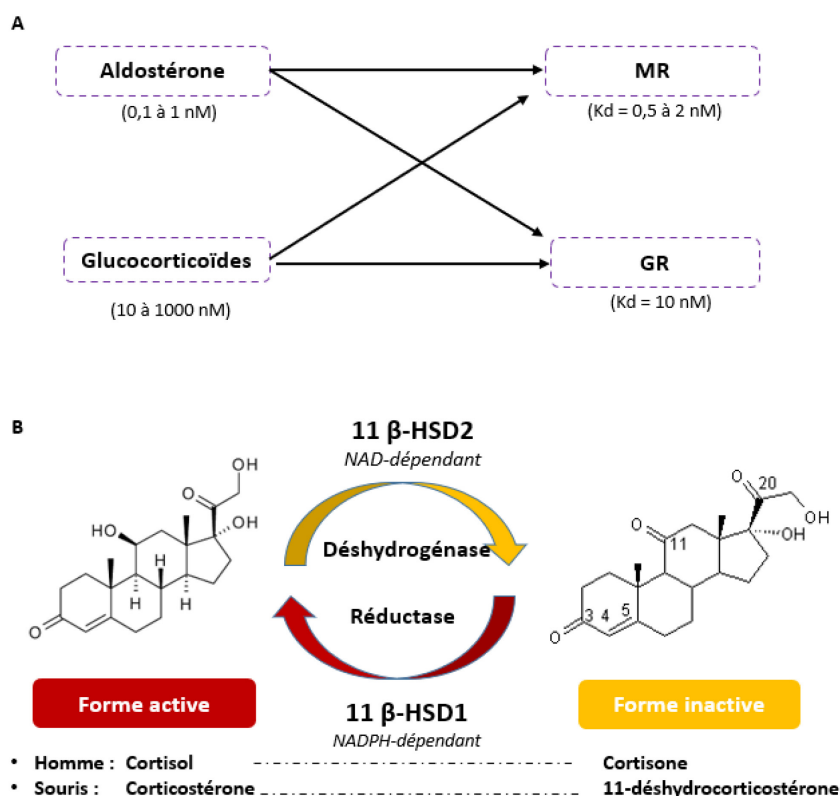


Figure 10 : Dualité entre les voies minéralocorticoïde et glucocorticoïde rénales et mécanismes de sélectivité de l'action de l'aldostérone sur le MR

A : Dualité entre les voies minéralocorticoïde et glucocorticoïde (D'après Farman and Rafestin-Oblin, 2001)

Kd : constant de dissociation

B : Mécanismes de sélectivité de l'action de l'aldostérone sur le MR

11β-HSD1 : 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1

11β-HSD2 : 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

Au niveau du récepteur, la sélectivité minéralocorticoïde est assurée par les changements conformationnels du MR. Bien que le MR puisse lier l'aldostérone et le cortisol avec une affinité équivalente (K_d), le complexe aldostérone-MR présente une plus grande stabilité avec une cinétique de dissociation plus tardive et des interactions N-/C-terminales plus fortes (Lombes et al., 1994; Rogerson et al., 1999).

Au niveau post-récepteur, de nombreux paramètres peuvent moduler l'activité transcriptionnelle du MR. Tout d'abord, la possibilité de former des homodimères MR-MR ou des hétérodimères, notamment avec le GR, a été démontré *in vitro* par notre équipe dans un modèle cellulaire rénale en utilisant des approches de CHIP en série et CHIP en tandem, favorisant la régulation fine de l'activité du MR (Le Billan et al., 2018). Ensuite, c'est la fréquence de recrutement du MR sur le promoteur du

gène cible en fonction du ligand. En effet, le recrutement dynamique et cyclique du MR sur le promoteur de *PER1* est ligand-dépendante, suggérant des transcriptions différentes en fonction du ligand (Le Billan et al., 2018). Enfin, le recrutement des corégulateurs par le MR peut être spécifique du ligand (Pascual-Le Tallec et al., 2005; Rogerson et al., 2014). Par exemple, le corégulateur tesmin est un coactivateur unique du MR lorsque celui-ci est activé par l'aldostérone (Rogerson et al., 2014). Par l'approche double-hybride chez la levure, Pascual-Le Tallec et al ont isolé un coactivateur du MR, ELL (*eleven-nineteen lysine-rich leukemia*), qui est un facteur d'élongation de l'ARN polymérase II (Pascual-Le Tallec et al., 2005). Il a été démontré que ce coactivateur du MR peut moduler de façon opposée l'activité transcriptionnelle des récepteurs MR et GR.

3.4.2. Voie non-génomique

A côté des effets génomiques, le MR participe également à la transduction du signal *via* une signalisation rapide ne faisant pas intervenir la transcription de gènes cibles (Mihailidou et al., 2019; Ruhs et al., 2017). Selon plusieurs études, il existe une signalisation membranaire rapide non génomique induite par l'aldostérone en seulement 15 min. Cet effet précoce n'est pas réversible après le traitement par l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription (Wehling et al., 1991) mais il est persistant lorsque l'aldostérone est conjuguée au BSA ou le PEG empêchant sa diffusion dans la membrane plasmique (Ashton et al., 2015; Le Moëllic et al., 2004). Cependant, aucun récepteur membranaire pour la MR n'a pu être identifié à ce jour. Aucun site de palmitoylation fonctionnel n'a été identifié dans la protéine MR. Le greffage d'un groupement palmitate sur une protéine permet son ancrage à la membrane plasmique comme cela a été rapporté pour le GR dans les cellules gonadotropes (Ayrout et al., 2017), pour l'ER (récepteur des estrogènes), pour le PR (récepteur de la progestérone) et aussi pour l'AR (récepteur des androgènes) (Pedram et al., 2002). Toutefois, le MR cytoplasmique pourrait interagir au niveau de la membrane plasmique avec des protéines d'échafaudage comme la striatine ou la cavéoline 1 (Ashton et al., 2015; Coutinho et al., 2014). Le MR sous-membranaire, activé par l'aldostérone, semble être capable d'activer d'autres récepteurs membranaires à proximité tels que des récepteurs à tyrosine kinase (EGFR, IGFR1) ou des récepteurs couplés à des protéines G (AT1R, GPER1 ou GPR30), permettant l'activation de différentes voies de signalisation (Ruhs et al., 2017). Dans le rein, les effets non-génomiques du MR renforcent les effets génomiques car ils permettent par exemple un adressage membranaire en quelques minutes des canaux ENaC à la membrane *via* l'activation de EGFR-PDK1 (McEaney et al., 2008), de la pompe Na⁺-K⁺-ATPase (Dooley et al., 2013) et le maintien de leur activité. Ces effets non-génomiques peuvent également contribuer de manière indirecte à la méthylation du promoteur du gène *SCNN1A* ou des

modifications d'histone (Zhang et al., 2006). Ces résultats indiquent que les effets non-génomiques du MR sont indissociables des effets génomiques et sont impliqués aussi dans la physiologie, et la physiopathologie de la voie de signalisation minéralocorticoïde.

3.5. Les mécanismes de régulation de l'expression et de la fonction du MR

De nombreuses études montrent le rôle important du MR dans la physiologie rénale. L'invalidation globale du gène *Nr3c2* conduit à la mort des souriceaux par déshydratation due à une perte urinaire massive de Na^+ à J8 (Berger et al., 1998). Chez le rat, la stratégie d'interférence ARN anti-MR prévient le développement d'hypertension artérielle induite par le froid et réduit l'atteinte rénale (Wang et al., 2006). Chez le nouveau-né à terme, la perte physiologique d'eau et de sel pendant la première semaine de vie, s'explique par une très faible expression rénale du MR, contrastant avec des taux d'aldostérone qui sont très élevés (Martinerie et al., 2009b). Par ailleurs, des modifications d'expression du MR ainsi que sa fonction sont associées à certaines maladies rénales. Par exemple, l'expression rénale du MR est augmentée et corrélée avec la gravité de la protéinurie (Quinkler et al., 2005). Notre équipe a aussi montré que les souris transgéniques surexprimant le MR présentent un phénotype rénal (dilatation tubulaire, réduction de la kaliurie) mais aussi cardiaque avec une cardiomyopathie dilatée modérée ou une tachyarythmie (Le Menuet et al., 2001). Des études suggèrent que l'activation inappropriée du MR dans les cellules rénales contribue aux lésions rénales par des mécanismes dépendants et indépendants de l'aldostérone et que le blocage du MR a des effets bénéfiques dans l'insuffisance rénale chronique (Nishiyama, 2019). Il est donc essentiel de disséquer les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression et/ou la fonction du MR à différents niveaux. La **Figure 11** décrit les différents niveaux de contrôle de l'expression et/ou de la fonction du MR : la régulation transcriptionnelle, la régulation post-transcriptionnelle et celle post-traductionnelle.

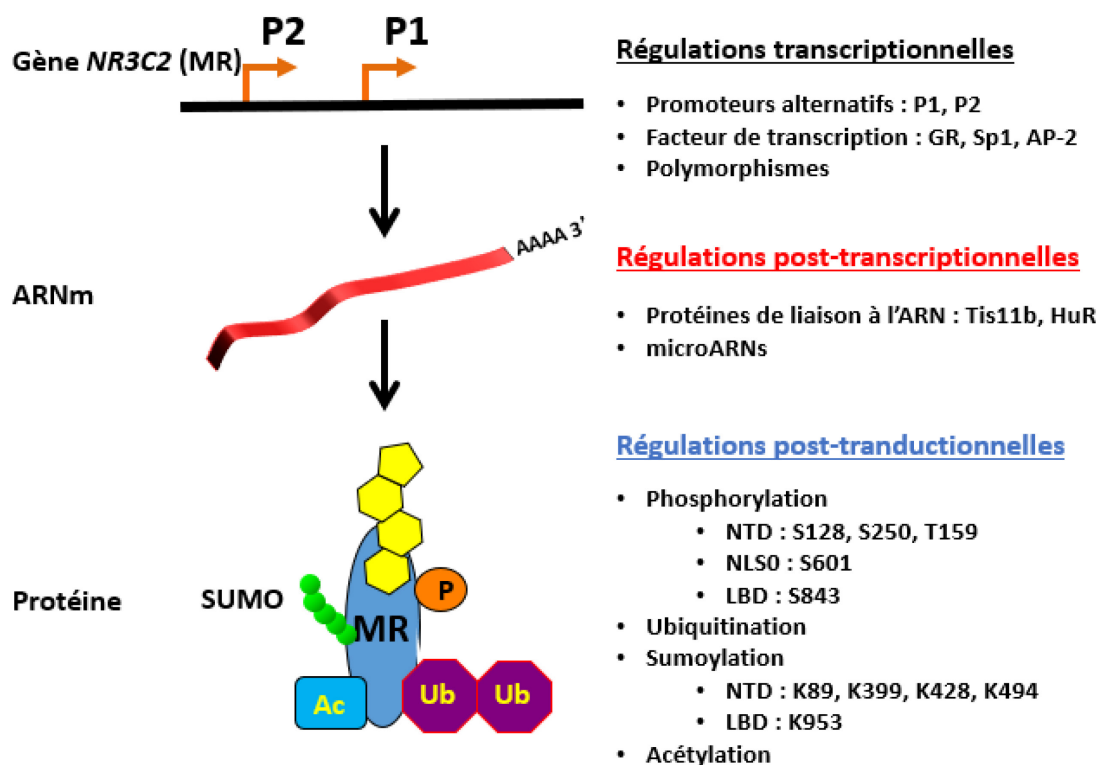


Figure 11 : Différents niveaux de contrôle de l'expression et/ou de la fonction du MR

Régulation transcriptionnelle

L'expression du MR est influencée par la présence et l'activité de ses promoteurs dès l'étape de la transcription. Le gène *Nr3c2* possède deux promoteurs P1 et P2. Ces deux promoteurs sont localisés en amont des deux premiers exons, respectivement l'exon 1 α et 1 β . Zennaro et al ont montré que le promoteur P1 est transcriptionnellement actif dans tous les tissus cibles du MR, avec une activité transcriptionnelle basale dix fois plus importante que celle du promoteur P2 (Zennaro et al., 1996). En revanche, l'activité du promoteur P2 semble être restreinte seulement au système nerveux central et au cours du développement (Le Menuet et al., 2000; Munier et al., 2010).

Comme pour tous les gènes, l'expression du MR dépend également du recrutement de facteurs de transcription. Il semblerait que le GR soit capable d'activer le promoteur P1 et le promoteur P2 en synergie avec le MR grâce à des interactions indirectes protéines-protéines (Zennaro et al., 1996). Par ailleurs, les facteurs de transcription Sp1 (*Specific Protein 1*) et AP-2 (*Activator Protein 2*) sont capables de se lier aux promoteurs du MR, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation transcriptionnelle du gène MR (Pascual-Le Tallec et al., 2004; Zennaro et al., 1996).

A noter qu'il existe des polymorphismes du gène *NR3C2*, situés dans les exons (polymorphismes dans les régions codantes) ou dans les régions non traduites du gène (polymorphismes ne modifiant pas la protéine) (J.-Q. Luo et al., 2014; van Leeuwen et al., 2010, 2011). Certains polymorphismes n'induisent pas de changement d'expression du MR (van Leeuwen et al., 2010). D'autres en revanche modifient l'expression du MR ou altèrent la sélectivité du MR pour l'aldostérone ou les glucocorticoïdes. Par exemple, les patients porteurs de l'allèle G pour le polymorphisme *rs2070951* (G/C) montrent une expression diminuée du MR *in vitro* et une augmentation de la pression artérielle et du taux d'aldostérone (van Leeuwen et al., 2011).

Régulation post-transcriptionnelle

La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes comprend tous les mécanismes qui affectent la stabilité et la demi-vie des molécules d'ARN produites lors de la transcription. Jusqu'à présent, il a été montré qu'il existe deux classes de régulateurs post-transcriptionnels : les protéines de liaison à l'ARN (RBP ou *RNA-Binding Protein*) ou les microARNs (Bartel, 2004; Keene, 2007).

Notre équipe étudie depuis longtemps les mécanismes de régulation de l'expression du MR dans les segments néphroniques qui sont soumis à d'importantes variations de tonicité extracellulaire, du fait de l'existence du gradient cortico-papillaire essentiel au transport de l'eau et des électrolytes (Viengchareun et al., 2009). Le MR est principalement exprimé dans le néphron distal, avec une expression très marquée dans le cortex rénal, là où la lumière du tubule est hypotonique, alors que son expression est plus faible dans la médullaire (Doucet and Katz, 1981; Lombes et al., 1990) qui est hypertonique.

Dans le tubule contourné distal du néphron, nous avons démontré pour la première fois que l'expression rénale du MR est régulée par les variations de tonicité extracellulaire *via* des mécanismes post-transcriptionnels. En utilisant les cellules principales KC3AC1, une lignée cellulaire murine immortalisée, isolée à partir de tubules collecteurs, notre équipe a démontré que l'expression des transcrits MR diminue en réponse à l'hypertonie (Viengchareun et al., 2009). Cette diminution coïncide avec l'augmentation de l'expression de TonEBP (*Tonicity responsive Enhancer Binding Protein*), un facteur de transcription connu pour réguler des gènes impliqués dans l'adaptation au stress osmotique. Parmi les gènes cibles activés par TonEBP, le gène *Zfp361*, qui code la protéine de liaison à l'ARN Tis11b, capable d'interagir avec la région 3'-non traduite (ou 3'UTR pour 3'-*UnTranslated Region*) de l'ARNm du MR, diminuant sa durée de vie en accélérant sa dégradation. En réponse à l'hypertonie, la protéine TonEBP est phosphorylée puis elle se fixe sur le promoteur du gène *Zfp361* pour activer sa transcription et stimuler son expression. Tis11b va alors se fixer sur

l'ARNm du MR et accélérer sa dégradation, diminuant ainsi sa traduction (Viengchareun et al., 2009). Plus précisément, Tis11b reconnaît des motifs ARE riches en A et U (pour *Adenosine Uridine Rich Elements*) présents dans la région 3'-UTR des ARN cibles. La région 3'-UTR du transcrit MR humain contient 7 ARE et notre équipe a montré que Tis11b interagissait directement avec ces motifs pour diminuer sa stabilité (Viengchareun et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur des reins de souris soumises à des conditions mimant l'hypertonie extracellulaire relative dans les parties distales du néphron (augmentation du flux de sodium dans le néphron distal par un traitement aigu (4 h) avec le furosémide, ou un régime riche en sel).

Notre équipe a également étudié l'influence de l'hypotonie sur l'expression rénale du MR, en utilisant à nouveau les cellules rénales KC3AC1. Nous avons d'abord montré que l'hypotonie entraîne une augmentation importante de l'expression du MR. Ensuite, nous avons démontré l'implication de la protéine de liaison à l'ARN, HuR (*Human antigen R, ELAV1*), qui est capable de stabiliser ses transcrits cibles. L'expression protéique de HuR n'est pas augmentée sous condition hypotonique, mais la protéine HuR est rapidement exportée vers le compartiment cytoplasmique comme cela a pu être démontré par des expériences d'imagerie obtenues avec le microscope haut débit. Dans le cytoplasme, HuR se fixe à des motifs ARE spécifiques, localisés dans la région 3'-UTR du transcrit MR et surtout sur un motif tige-boucle essentiel. Cette liaison de HuR stabilise le transcrit MR et conduit à une augmentation de l'expression de la protéine MR, affectant la transcription des gènes cibles de l'aldostérone (Lema et al., 2017a). Lema et al ont, par la suite, montré que cette liaison conduit à une diminution de l'expression du variant $\Delta 6$ du MR, une isoforme dans laquelle l'exon 6 est excisé, et qui exerce un effet dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle du MR (Lema et al., 2017b). Cela aboutit à une augmentation de la traduction du MR, avec un effet significatif sur la transcription des gènes cibles du MR et notamment du gène *Sgk1*.

Récemment, les microARNs (ou miARNs), petits ARN simples brins capables de s'apparier à des ARN dits cibles, ont été identifiés comme étant une seconde classe de régulateurs post-transcriptionnels chez les eucaryotes. Söber et al sont les premiers auteurs à avoir réalisé des analyses bio-informatiques sur la région 3'-UTR du transcrit MR et ils ont montré que les miR-124 et miR-135a pourraient cibler le transcrit MR (Söber et al., 2010). En clonant la région 3'-UTR du transcrit MR en aval du gène rapporteur de luciférase, ces auteurs ont démontré que le recrutement de miR-124 et de miR-135a inhibe l'activité luciférase. Dans les cellules HeLa, qui sont des cellules cancéreuses provenant du col de l'utérus d'une patiente, la transfection de ces 2 miARNs n'induit pas de diminution des transcrits MR, suggérant que ces miARNs affecteraient la traduction plutôt que la stabilité du transcrit MR mais aucune preuve directe de cet effet n'a été mise en évidence à l'époque. Trois ans plus tard, Mannironi et al ont montré une diminution de l'activité luciférase et de l'expression protéique du MR après

surexpression du miR-124 et miR-135a (Mannironi et al., 2013). Ces auteurs ont notamment montré une corrélation négative entre l'expression de ces deux miARNs avec l'expression protéique du MR suggérant l'importance de ces deux miARNs dans la régulation de l'expression du MR dans le complexe amygdalien chez la souris en réponse à un stress aigu.

Par la suite, de plus en plus de publications ont rapporté un rôle des miARNs dans le contrôle de l'expression du MR dans des tissus cancéreux. Par exemple, il a été récemment rapporté que le miR-301b réprime l'expression du MR dans l'adénocarcinome pancréatique contribuant à limiter l'agressivité de la tumeur (Yang et al., 2016). Dans la même idée, Zhang et al ont montré que le miR-135b-5p favorise la migration, l'invasion, et la transition épithélio-mésenchymateuse en ciblant le gène *NR3C2* (Zhang et al., 2017), ce qui permet de mettre en lumière le mécanisme favorisant les métastases du cancer pancréatique. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression du miR-4709 facilite la prolifération et l'invasion de l'adénocarcinome du colon, qui est associée à une faible expression du MR et à mauvais pronostic (Yu et al., 2019). Le miR-454 favorise la prolifération des cellules du carcinome épidermoïde buccal *via* la répression du gène *NR3C2*. Néanmoins, le rôle de ces miARNs n'a pas été montré comme étant sous l'action de l'aldostérone.

Certaines études abordent également le nouveau rôle des miARNs dans la voie de signalisation minéralocorticoïde dans le remodelage cardiaque (Garg et al., 2020), l'inflammation et dans le traumatisme neuronal après un accident cérébral (Huang et al., 2020). Dans le contexte rénale, une étude de Ozbaki-Yagan vient de montrer que l'expression du miR-466 est induit par l'aldostérone et que ces régulateurs peuvent cibler les transcrits MR et *Sgk1* (Ozbaki-Yagan et al., 2020). S'agissant du rein, il n'y avait pas jusqu'à présent, d'étude rapportant un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR dans les segments néphroniques soumis aux variations de tonicité ou au cours du développement rénal chez les nouveau-nés.

Régulation post-traductionnelle

En dehors des régulations transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles, plusieurs modifications post-traductionnelles du MR permettent de moduler son activité, sa dégradation et donc son expression (**Figure 11**)

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle, ajoutant un groupement phosphate sur un résidu tyrosine, sérine ou thréonine, qui permet de réguler la stabilité, le trafic et l'activité de diverses protéines. Ainsi, la phosphorylation du MR a été décrite comme une modification post-traductionnelle pouvant altérer son affinité pour l'aldostérone, son transfert nucléaire et ses effets non-génomiques (Faresse, 2014; Jiménez-Canino et al., 2016; Le Moëllic et al., 2004). Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés dans les différents domaines du MR : les sérines 128 et 250 et la

thréonine 159 dans le domaine N-terminal, la sérine 601 dans le signal indépendant du ligand NLS0, et la sérine 843 dans le LBD.

Le MR subit également des processus d'ubiquitination qui correspond au greffage peu ou très partiellement réversible d'un ou plusieurs groupements d'ubiquitine sur une lysine. L'ubiquitine est un petit polypeptide de 8,5 kDa, dont la liaison à une protéine nécessite trois étapes enzymatiques consécutives catalysées par une enzyme d'activation E1, de conjugaison E2 puis une ligase E3 (Helzer et al., 2015; Kerscher et al., 2006). L'ubiquitination est impliquée dans la dégradation des protéines, permettant leur adressage au protéasome, qui est un complexe de protéases cytoplasmiques, responsable du recyclage des protéines, et qui est associé au réticulum endoplasmique (Lee and Lee, 2012). L'activité transcriptionnelle du MR est régulée par l'ubiquitination, notamment *via* une interaction directe avec la ligase de type E3 CHIP (*COOH terminus of Hsp70- Interacting Protein*) (Faresse et al., 2010). Faresse et al. ont aussi étudié le rôle de USP2-45 (*Ubiquitin-Specific Protease*), dont la transcription est activée par l'aldostérone dans une lignée murine de cellules du tubule contourné distal (Faresse et al., 2013). En effet, UPS2-45 interagit directement avec le MR en présence d'aldostérone favorisant son ubiquitination, sa dégradation et son adressage au protéasome. Il a été montré que l'inhibition du protéasome perturbe l'activité transcriptionnelle du complexe aldostérone-MR sur un gène rapporteur luciférase, indiquant que le recyclage du MR *via* l'ubiquitine est une étape importante pour l'activation de la signalisation par l'aldostérone (Tirard et al., 2007). Mais l'inhibition du protéasome empêche aussi la phosphorylation activatrice du MR liée à l'aldostérone (Faresse et al., 2012). Ainsi, il est nécessaire de maintenir une balance entre la phosphorylation et l'ubiquitination pour réguler l'activité transrégulatrice du MR activé par l'aldostérone (Faresse, 2014; Wallace and Cidlowski, 2001).

La troisième modification post-traductionnelle du MR est représentée par la sumoylation qui correspond à l'addition covalente et réversible d'un groupement SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) sur un résidu lysine (Melchior, 2000). Comme l'ubiquitination, la sumoylation est réalisée en trois étapes enzymatiques (trois enzymes successives : E1 d'activation, E2 de conjugaison puis une ligase E3). Cette modification régule les facteurs de transcription essentiellement au niveau de leur transfert nucléo-cytoplasmique et de leur activité transcriptionnelle (Yang and Chiang, 2013). Le MR est sumoylé avec des protéines SUMO 1 (*Small Ubiquitin-related Modifier 1*) par l'enzyme de conjugaison (E2) Ubc9 sur le motif consensus $\Psi KxD/E$ (avec Ψ un résidu hydrophobe, K la lysine cible, x un résidu quelconque et D/E un résidu acide). Le MR possède 5 lysines capables d'être sumoylées dont 4 dans le domaine N-terminal. Le MR sumoylé interagit avec le corépresseur PIAS 1 (*Protein Inhibitor of Activated Signal transducer 1*) qui agit comme une SUMO ligase (E3) et conduit à une répression de l'activité transcriptionnelle ligand-induite du MR (Pascual-Le Tallec and Lombès, 2005).

Enfin, l'activité du MR est aussi modulée par des phénomènes d'acétylation/désacétylation, et d'oxydation (Faresse, 2014). L'acétylation du MR inhibe son activité transcriptionnelle. Il a été rapporté que l'augmentation de l'acétylation du MR sur la lysine en position 677 (région charnière), par l'inhibition de la désacétylation, empêche le recrutement de l'ARN Pol II sur le promoteur des gènes cibles (Lee et al., 2013).

En conclusion, l'ensemble de ces modifications post-traductionnelles du MR agissent de façon coordonnée pour réguler son expression, son activation par l'aldostérone, sa localisation subcellulaire, son activité trans-régulatrice et sa dégradation.

4. MicroARNs (miARNs)

4.1. Généralités

Les microARNs (miARNs) sont des petites séquences d'acide ribonucléique (21-24 nucléotides) endogènes, simple brin, transcrites mais non traduites qui contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel (Bartel, 2004). Découvert initialement en 1993 chez le nématode *C. elegans*, les miARNs ont ensuite été identifiés dans d'autres organismes. Ils se sont révélés être d'importants régulateurs de nombreux processus biologiques, impliqués dans divers systèmes tels que le système nerveux central (Taouis, 2016), le système cardiovasculaire (Çakmak and Demir, 2020), le cancer (Cherradi, 2015). Les miARNs ont été détectés par plusieurs approches : soit par clonage puis séquençage, soit par une approche bio-informatique utilisant des logiciels de prédiction basés sur la conservation des miARNs au sein des espèces et sur la détection de structures en « tige-boucle » caractéristiques des précurseurs des miARNs. Il existe une base de données, appelée miRBase (Griffiths-Jones et al., 2008), qui permet de recenser les miARNs cités dans les publications scientifiques et qui ont été mis en évidence par clonage puis séquençage principalement. La dernière version de la base de données miRBase (v22) contient 38589 miARNs précurseurs provenant de 271 organismes. Ces derniers produisent un total de 48860 séquences différentes de miARNs matures, dont 2654 séquences matures sont identifiées chez l'homme (Kozomara et al., 2019).

4.2. Biogenèse et dégradation des miARNs

4.2.1. Localisation et structure des gènes codant les miARNs

Les miARNs peuvent être issus des régions inter- ou intra-géniques dans lesquelles ils se trouvent soit isolés, soit le plus souvent regroupés en « cluster » (Olena and Patton, 2010). Les miARNs sont issus de

gènes ayant leurs propres promoteurs et éléments régulateurs (miARNs intergéniques). Les miARNs issus des régions intra-géniques peuvent provenir des introns (miARNs introniques), des exons (miARNs exoniques) ou encore être chevauchants sur des sites d'épissage (*splice-site-overlapping miARN*) (mirtrons) des transcrits des gènes codants ou non codants (Finnegan and Pasquinelli, 2013; Morlando et al., 2008). Les promoteurs des miARNs intra-géniques se situent soit en amont de sa séquence, soit dans le même promoteur du gène hôte. Dans le cas où les miARNs possèdent le même promoteur que le gène hôte, la transcription aura lieu en parallèle de celle du gène hôte (Rodriguez et al., 2004).

4.2.2. Biogenèse des miARNs

Transcription des pri-microARNs

La **Figure 12** illustre les étapes de la biogenèse des miARNs (Aguado-Fraile et al., 2013; Fabian and Sonenberg, 2012; Krol et al., 2010; Saliminejad et al., 2019). La majorité des miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II (ARN Pol II) à partir du transcrit du gène hôte ou à partir d'une unité transcriptionnelle indépendante. Plus rarement, lorsque la séquence du miARN est proche de celle des séquences de répétitions Alu (courts fragments d'ADN appartenant à la famille des petits éléments nucléaires intercalés ou SINE-*short interspersed nuclear element*, caractérisés par la présence d'un site de restriction de l'endonucléase de restriction (5'-AGCT-3'), la transcription est réalisée par l'ARN polymérase III (ARN Pol III) (Borchert et al., 2006). La première étape de la biogenèse des miARNs est la synthèse dans le compartiment nucléaire sous forme d'un miARN primaire (Pri-miARN), qui comporte une région en épingle à cheveux (constituée par un motif tige/boucle), une « coiffe » en 5' (7-méthylguanosine triphosphate (m7G)) et une queue de poly-Adénine ou poly(A) à son extrémité 3' (Finnegan and Pasquinelli, 2013; Krol et al., 2010). Ce dernier présente également d'une région double brin longue de 33-35 nucléotides, et présentant des mésappariements.

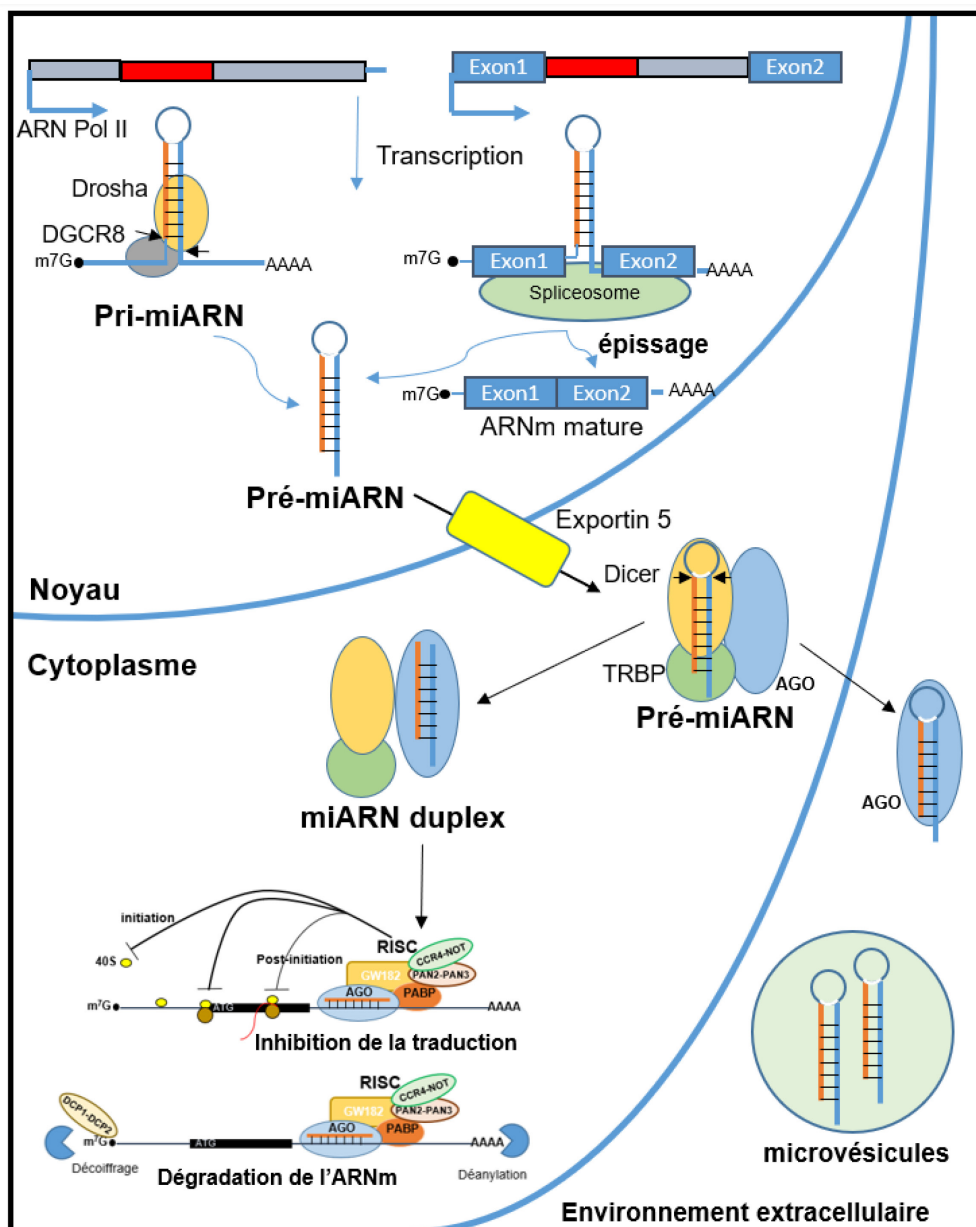


Figure 12 : Biogenèse et mécanisme d'action des microRNAs

(Adapté selon Aguado-Fraile et al., 2013; Fabian and Sonenberg, 2012; Krol et al., 2010; Saliminejad et al., 2019)

Pri-miARN : microARN primaire ; Pré-miARN : miARN précurseur ; DGCR8 : DiGeorge syndrome Critical Region Gene 8 ; m7G : 7-méthylguanosine-cap ; AGO : Protéine Argonaute ; TRBP : Trans Activation Responsive RNA-Binding Protein ; RISC : RNA-Induced Silencing Complex ; GW182 : Protéine Glycine-Tryptophan 182 kDa ; PABP : Poly (A) binding protein

Clivage du pri-miARN en pré-miARN

Le pri-miARN subit ensuite plusieurs étapes de maturation pour générer un miARN mature. Il est clivé une première fois par le microprocesseur Drosha/DGCR8 pour générer le précurseur de miARN appelé

pré-miARN (**Figure 12**). C'est un ARN long d'environ 70-100 nucléotides, replié en tige-boucle par complémentarité de bases imparfaite entre la première moitié et la deuxième moitié de sa séquence. Le microprocesseur, présent dans le noyau, est un complexe protéique formé par l'enzyme endoribonucléase RNase III Drosha et la protéine DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*). La protéine DGCR8 est essentielle au processus de clivage par Drosha car elle mesure la distance entre les fragments simples brins et les fragments double brin, grâce à ses domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRBD, *double-stranded RNA binding domain*), pour la détermination du site de clivage et facilite l'accès du site de clivage à Drosha. Drosha, constitué des deux domaines RNase IIIa et IIIb (RIIIda et b), se positionne alors au centre et clive le duplex d'ARN à 11 paires de bases (pb) après la jonction (Han et al., 2006).

Pour les miARNs dont le précurseur pri-miARN correspond à une partie de l'intron (mirtrons), l'étape catalysée par Drosha permettant de générer le pré-miARN, se déroule au même moment que l'épissage (*splicing*) (Morlando et al., 2008). La maturation des miARNs exoniques est moins bien connue. Une étude récente du miR-155 a montré que son pré-miARN peut être produit à partir de transcrits épissés ou non épissés. L'épissage et le transport cytoplasmique des transcrits épissés constitue toutefois des mécanismes permettant de réguler le taux de miARNs exoniques (Slezak-Prochazka et al., 2013).

Export nucléaire des pré-miARNs

Le pré-miARN doit à son tour subir une maturation afin de produire le miARN fonctionnel. Pour cela, il doit être transféré vers le cytoplasme où a lieu la deuxième étape de clivage (**Figure 12**) grâce à son interaction avec l'Exportine 5 (EXP5, codé par le gène *XPO5*), qui est couplée au cofacteur nucléaire RAN-GTP (*RAS-related Nuclear protein – Guanosine TriPhosphate*). L'EXP5 s'associe à la région double brin du précurseur en reconnaissant la structure double brin ainsi que le bras simple brin en 5' du précurseur (Kim, 2004). Le guidage du pré-miARN vers le cytoplasme se fait à travers les pores nucléaires. Le complexe formé par EXP5/RAN-GTP/pré-miARN se dissocie à la suite de l'hydrolyse de la molécule de GTP en GDP (*Guanosine DiPhosphate*) libérant ainsi le pré-miARN pour la suite du processus de maturation (Ha and Kim, 2014).

Clivage du pré-miARN en miARN double brin

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN doit subir un deuxième clivage par l'endoribonucléase DICER, qui est une RNase III cytoplasmique, pour générer la forme mature du miARN dont la séquence fait entre 21-24 nucléotides (nt). L'enzyme DICER se caractérise par la présence d'un domaine hélice, d'un domaine PAZ (PIWI-Argonaute-ZWILLE), d'un domaine de liaison à l'ARN double brin et de deux domaines RIIIda et b. Le domaine PAZ sert à reconnaître le petit bras de 2 nt à la base de la tige du pré-

miARN alors que les deux domaines RIID se dimérisent et forment un centre catalytique similaire à celui de Drosha, qui entoure la tige du pré-miARN. Le domaine hélice facilite la reconnaissance du pré-miARN en interagissant avec la boucle terminale. Une fois que le pré-miARN est pris en charge par la protéine DICER, chaque domaine RIID coupe un des deux brins de la tige libérant ainsi la boucle du reste du précurseur qui devient une molécule d'ARN double brin (Finnegan and Pasquinelli, 2013; Ha and Kim, 2014). L'activité d'hydrolyse de la structure boucle de DICER, pour libérer un miARN double brin, est renforcé par le facteur protéique TRBP (*Trans-Activation Responsive RNA-Binding Protein*). La protéine TRBP est une protéine de liaison à l'ARN capable, par interaction directe avec DICER, d'augmenter son efficacité de clivage. Certaines études ont montré que l'interaction entre ces deux protéines stabilise DICER (Chendrimada et al., 2005; Koscianska et al., 2011), alors que d'autres indiquent que l'absence de TRBP induit une diminution des niveaux de miARNs matures et/ou des précurseurs de miARNs (Chakravarthy et al., 2010; Haase et al., 2005).

Génération de miARNs matures par la prise en charge par le complexe RISC

Ce miARN double brin est ensuite pris en charge par les protéines de la famille Argonaute (AGO) pour former d'autres facteurs protéiques, le complexe pré-RISC (*RNA-induced Silencing complex*), qui permet le passage d'un miARN double brin à un miARN simple brin (brin 5' ou 3'). Les deux brins coexistent dans des pourcentages variables selon les miARNs, les types cellulaires, et le mécanisme de sélection. Le complexe miRISC, constitué par un miARN avec le brin « majeur » et une protéine AGO auxquels s'associent d'autres facteurs tels que la protéine GW182 ou PABP (Poly (A) Binding Protein), joue un rôle de répresseur post-transcriptionnel en s'hybridant à l'ARNm cible au niveau de séquences spécifiques généralement présentes dans la région 3'-UTR de l'ARNm cible, bloquant ainsi la traduction, ou accélérant la dégradation de l'ARNm cible. Le brin « mineur » est soumis à la dégradation.

Les protéines de la famille AGO jouent un rôle central dans le complexe RISC. Chez l'homme, cette famille contient quatre protéines : AGO1, AGO2, AGO3 et AGO4 qui sont toutes capables de se lier à des miARNs. Toutefois, seule AGO2 possède une activité catalytique de clivage de l'ARNm cible uniquement lors d'une complémentarité parfaite entre le miARN et sa cible (Meister et al., 2004). Elkayam et al ont décrit la structure des protéines AGO2 qui présentent quatre domaines (**Figure 13**) : le domaine N-terminal, le domaine PAZ, le domaine MID (MIDDLE) et le domaine PIWI (*P-element-Induced Wimpy testes*) (Fabian and Sonenberg, 2012). Normalement, l'extrémité 3' du miARN est fixée sur le domaine PAZ, alors que l'extrémité 5' du miARN est stabilisée dans une poche du domaine MID. La région centrale du miARN se retrouve dans le domaine PIWI qui s'en sert pour son activité catalytique.

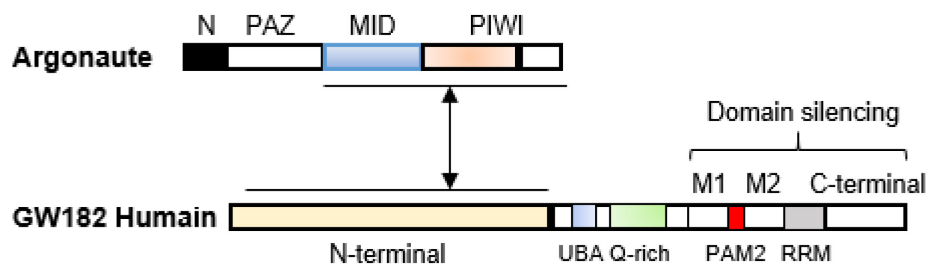


Figure 13 : Structure des protéines Argonautes (Ago) et GW182 humain

(D'après Fabian and Sonenberg, 2012)

L'association à une protéine GW182 est également indispensable à la fonctionnalité du complexe RISC (Behm-Ansmant et al., 2006). La **Figure 13** décrit également la structure de la protéine GW182 humain. Cette protéine de 182 kDa possède un domaine N-terminal enrichi en répétition glycine-tryptophane (GW) permettant son association avec les membres de la famille AGO et d'un domaine C-terminal participant au recrutement des partenaires affectant la stabilité de l'ARNm cible par la désadénylation de la queue poly(A) et/ou l'élimination de la coiffe en 5' ou ceux qui empêchent la traduction des protéines du gène cible.

4.2.3. Dégradation des miARNs

Actuellement, peu de données sont connues sur la stabilité et la dégradation de ces petits ARNs. Les mécanismes intervenant dans la dégradation des miARNs sont encore très imparfaitement connus. D'après Rüegger, les miARNs tissulaires, après avoir été relâchés par la protéine AGO, sont dégradés par des exoribonucléases dans le sens 3' → 5' et 5' → 3' : notamment, la protéine RRP41 (*ribosomal RNA processing protein 41*) et la polynucléotide phosphorylase (PNPase) qui dégradent certains miARNs dans le sens 3' → 5' alors que XNR-1 agit dans le sens 5' → 3' (Rüegger and Großhans, 2012). Comme pour les ARNs, la demi-vie des miARNs dépend de plusieurs éléments : l'activité transcriptionnelle de leurs gènes, les processus de maturation, leur séquence, leur état d'association avec leur ARNm cible ou avec différents facteurs protéiques, leur localisation cytoplasmique (Krol et al., 2010; Zendjabil et al., 2017). Récemment, Gantier *et al.* ont montré que la demi-vie moyenne d'un miARN serait de 5 jours, soit dix fois plus qu'un ARNm dans une cellule ne se divisant pas, en mesurant leur vitesse de dégradation après délétion génétique par l'induction de DICER dans des cellules MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblastes*) immortalisées (Gantier et al., 2011). Cette étude a conclu que les miARNs sont généralement très stables. Pourtant, cette stabilité dépend des cellules et des tissus dans lesquels les miARNs sont exprimés. Par exemple, la dégradation de certains miARNs a lieu très

rapidement dans le cerveau, leur demi-vie n'excédant pas 3,5 heures (Sethi and Lukiw, 2009). Afin de mesurer la stabilité des miARNs, l'équipe de Bail et al. a utilisé une approche de microarrays afin d'identifier l'expression de miARNs dans les cellules HEK 293 après avoir bloqué la transcription pendant 8 h par l'Actinomycine D (Bail et al., 2010). Leurs résultats ont montré que l'expression de 95 % des miARNs étudiés ne change pas de façon significative après 8 h suggérant ainsi que la demi-vie des miARNs est supérieure à 8 heures. Cependant, il faut noter que l'actinomycine D affecte seulement l'étape de transcription des pri-miARNs. Afin d'apprécier plus directement la stabilité des miARNs, cette équipe a contrôlé l'expression de DICER avec des shARN et ils ont observé un profil hétérogène pour la stabilité des différents miARNs. En particulier, l'équipe a montré que certains éléments en partie 3' facilite la dégradation des miARNs. En résumé, la stabilité des miARNs dans les tissus est hétérogène et dépend à la fois de la nature même du miARN et du type cellulaire dans lequel il est exprimé (Marzi et al., 2016; Nguyen et al., 2014).

4.3. Nomenclature des miARNs

Nomenclature	Notes
hsa-miR-XX mmu-miR-XX rno-miR-XX	L'espèce chez laquelle le miARN a été découvert hsa = <i>homo sapiens</i> mmu = <i>mus musculus</i> rno = <i>rattus norvegicus</i>
hsa-mir-XX hsa-miR-XX	Le gène ou précurseur de miARN ou miARN mature
hsa-miR-XX-5p hsa-miR-XX-3p	XX : l'ordre de la découverte chez une espèce et de l'ajout dans les bases données 5p, 3p : position dans pré-miARN
hsa-miR-XX-1 hsa-miR-XX-2	Séquences de miARNs identiques obtenus à partir de 2 gènes différents
hsa-mir-XX-1 hsa-mir-XX-2	Précurseurs de miARNs différents mais produisant le même miARN
hsa-miR-XXa hsa-miR-XXb	2 miARNs similaires (produits par 2 gènes différents) qui ont une même séquence de reconnaissance pour leur ARNm cible mais qui ne diffèrent que par un, deux ou trois nucléotides dans la partie 3'

Tableau 2 : Nomenclature des miARNs

(Adapté selon Bernardo et al., 2012; Zendjabil et al., 2017)

Le **tableau 2** présente la nomenclature des miARNs (Adapté selon Bernardo et al., 2012; Zendjabil et al., 2017). Un miARN est généralement identifié sous la forme : hsa-miR-XX. Les trois premières lettres indiquent l'espèce chez laquelle le miARNs a été découvert (hsa pour *homo sapiens*, mmu pour *mus musculus*) alors que le nombre (XX) désigne l'ordre de découverte du miARNs chez cette espèce et celui de son référencement dans la base de données miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Pour deux miARNs provenant d'un même précurseur, le plus abondant était auparavant nommé miR-XX et le

moins abondant miR-XX*. Mais cette nomenclature a été depuis abandonnée. Indépendamment de leur abondance, on identifie à présent les miARNs en fonction de leur position dans la séquence du précurseur de miARN (pré-miARN) : miR-XX-5p et miR-XX-3p. Le gène et le précurseur (pré-miARN) d'un miARN sont notés « mir » alors que le miARN mature correspondant est noté « miR ». Afin de distinguer des miARNs identiques mais obtenus à partir de deux gènes différents, on écrira hsa-mir-XX-1 et hsa-mir-XX-2 et par exemple hsa-miR-XX-1-3p pour désigner l'une des formes du miARN mature. Pour deux miARNs similaires (produits par deux gènes différents) qui ont une même séquence de reconnaissance dans leur ARNm cible (séquence «seed» comprenant les nucléotides en 5' aux positions 2 à 7 ou 8), mais qui ne diffèrent que par un, deux ou trois nucléotides dans les parties 3', on désignera leurs deux gènes en ajoutant une lettre : hsa-mir-XXa et hsa-mir-XXb seront respectivement à l'origine des miARNs hsa-miR-XXa-5p et hsa-miR-XXb-5p. On peut trouver toute sorte de combinaisons dans la nomenclature de la famille de miR-30 (**Tableau 3**). En outre, certains miARNs ont gardé leurs noms historiques comme « lin-4 » et « let-7 ».

Pre-miARNs	miARNs matures	Accession Numbers	Séquence des miARNs matures
Hsa-mir-30a	Hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG
	Hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
Hsa-mir-30b	Hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	UGUAAACAUCUACACUCAGCU
	Hsa-miR-30b-3p	MIMAT0004589	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC
Hsa-mir-30c-1	Hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC
	Hsa-miR-30c-1-3p	MIMAT0004674	CUGGGAGAGGGUUGUUACUCU
Hsa-mir-30c-2	Hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC
	Hsa-miR-30c-2-3p	MIMAT0004550	CUGGGAGAAGGUGUUUACUCU
Hsa-mir-30d	Hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG
	Hsa-miR-30d-3p	MIMAT0004551	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC
Hsa-mir-30e	Hsa-miR-30e-5p	MIMAT0000692	UGUAAACAUCUUGACUGGAAG
	Hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC

Tableau 3 : Exemple d'une combinaison dans la nomenclature des miARNs et leur complexité

4.4. Fonctions des miARNs

4.4.1. Répression post-transcription

Les miARNs sont connus comme des régulateurs négatifs post-transcriptionnels. Cette action peut affecter la stabilité des ARNm cibles en induisant la désadénylation de la queue poly(A) et/ou l'élimination de la coiffe en 5' (Behm-Ansmant et al., 2006; Mathonnet et al., 2007). En outre, l'action

de répression par les miARNs peuvent également affecter la traduction des gènes cibles en bloquant l'initiation, l'élongation de la traduction ou après la traduction (Fabian and Sonenberg, 2012; Jackson and Standart, 2007; Pasquinelli, 2012). Cette action peut être directe ou indirecte. Les mécanismes de répression post-transcriptionnelle seront détaillés dans la partie 4.5 de cette introduction.

4.4.2. Activation de l'expression des gènes par les miARNs

Dans certains cas, l'activation par des miARNs de l'expression des gènes a également été rapportée dans la littérature. Ce mécanisme d'activation est généralement indirect par l'inhibition d'un répresseur permettant ainsi d'augmenter l'expression de certains gènes. Par exemple, dans le cerveau, miR-128 inhibe l'expression de certains composants du complexe NMD (*nonsense-mediated decay*), appartenant à la machinerie de dégradation des ARNm, cela conduit donc à l'augmentation de l'expression d'ARNm impliqués dans la fonction et la différenciation neuronale (Bruno et al., 2011). Pourtant, il a été rapporté qu'un miARN peut favoriser aussi la traduction d'un ARNm cible à la suite de sa liaison directe à l'ARNm soit au niveau de sa séquence codant soit de sa région 5'-UTR (Ørom et al., 2008). Par exemple, miR-10a, en s'hybridant à la région 5'-UTR d'un ARNm codant une protéine ribosomale, active sa traduction en condition de déprivation d'acides aminés (Ørom et al., 2008). Cet effet dépend également des partenaires des protéines AGO et du contexte cellulaire (type cellulaire, stress, cycle cellulaire) (Vasudevan et al., 2007). L'étude de Vasudevan en 2007 a montré que miR-369-3p peut activer la traduction de TNF α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) en se fixant sur sa région 3'-UTR avec la protéine FMR1 (*Fragile X mental Retardation protein 1*) en condition de déprivation de sérum (Vasudevan et al., 2007). Un autre exemple est celui du miR-145 qui induit la traduction de la myocardine mais réprime la traduction du facteur Klf4 (*Kruppel-like factor 4*) lors de la différenciation musculaire (Cordes et al., 2009).

4.4.3. Rôle dans le noyau

Les miARNs sont également détectés au niveau du noyau dans lequel les miARNs peuvent jouer un rôle de répression et d'activation la transcription de certains ARN nucléaires (Salmanidis et al., 2014). Dans la revue de Salmanidis et al, les miARNs, présents dans le complexe RITS (*RNA-induced transcriptional silencing*), peuvent agir comme des facteurs de transcription en se fixant sur des promoteurs de gènes par complémentarité de séquences. Dans certains cas, les miARNs peuvent jouer un rôle épigénétique en favorisant ou en inhibant le recrutement de l'ARN Pol II et de facteurs favorisant la formation de l'hétérochromatine (Morales et al., 2017; Piletič and Kunej, 2016).

4.5. Mécanisme de répression post-transcriptionnelle

Les miARNs, lorsqu'ils sont intégrés au sein du complexe RISC, peuvent réguler l'expression génique en réprimant la traduction et/ou en déstabilisant puis en dégradant l'ARNm cible. Bien qu'ils ne représentent que 1% à 3% du génome humain (Bartel, 2009), les miARNs sont capables à réguler entre 30% et 60% des ARNm (Friedman et al., 2009). Le mécanisme d'action d'un miARN dans le complexe RISC commence tout d'abord par la reconnaissance de son ARNm cible puis par le recrutement des complexes favorisant le blocage de la traduction ou la dégradation de l'ARNm.

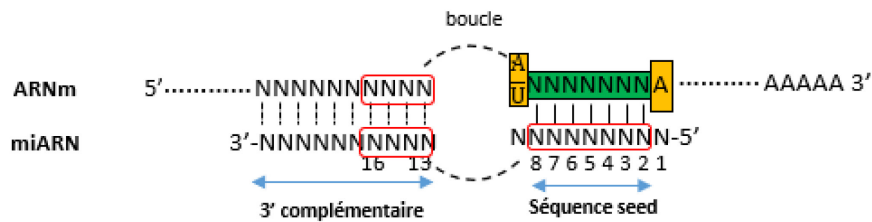
4.5.1. Reconnaissance de l'ARNm cible par le miARN

La reconnaissance de l'ARNm cible est l'étape essentielle et spécifique de l'action répressive des miARNs. Cette reconnaissance est rendue possible grâce à la complémentarité de la séquence du miARN avec leur site de liaison ou miRE (*microRNA response elements*), principalement situé dans la région 3'-UTR de l'ARNm cible. Certaines études ont montré que les miARNs pourraient également se fixer sur la région 5'-UTR ou sur la séquence codante, même au niveau des ORF (*open reading frame*, phase ouverte du cadre de lecture), chez l'homme et la drosophile (Ørom et al., 2008; Schnall-Levin et al., 2010). Toutefois, la fixation dans ces régions est minime et favorise d'autres fonctions. Dans la majorité des cas, cette complémentarité entre les miARNs et leur gènes cibles est imparfaite au niveau de la séquence « seed » chez les mammifères. La **Figure 14A** illustre l'interaction entre un miARN et son ARNm cible. Un miARN mature possède généralement deux parties : une partie 5' et une partie 3'. La partie 5' très conservée entre les espèces contient une séquence noyau ou « seed » comprenant généralement les nucléotides 2 à 7 de la région 5', qui permet de déterminer la liaison à l'ARNm cible alors que la partie 3' permet de moduler la stabilité de cette interaction (Doench and Sharp, 2004; Filipowicz et al., 2008). La suite de la séquence « seed » (du nucléotide 9 à 11) du miARN présente soit des mésappariements avec l'ARNm cible soit forme un boucle qui ne lie pas totalement à l'ARNm afin d'empêcher le clivage par AGO2 (Brennecke et al., 2005). La reconnaissance de l'ARNm cible dépend en particulier du type d'appariement entre le miARN et son ARNm cible mais aussi de plusieurs autres éléments qui sont abordés ci-dessous.

Type d'appariement

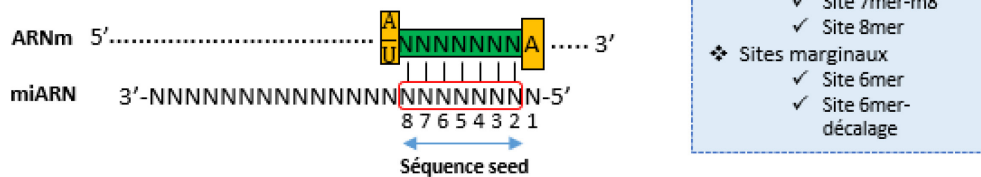
Il existe plusieurs types d'appariement entre un miARN et son ARNm cible (**Figure 14B**). Selon Bartel, les types d'appariement de type canonique et marginal sont les plus fréquents (Bartel, 2009). Les miREs de type canonique sont caractérisés par un appariement parfait de type Watson-Crick aux nucléotides 2 à 7 de la région 5' du miARN et une adénosine en face du nucléotide en position 1 du miARN (Site 7 mer-A1) ou avec un appariement additionnel en position 8 (Site 7 mer-m8) ou avec la présence à la fois de l'adénosine et de l'appariement additionnel en position 8 (Site 8 mer) (**Figure 14B-1**). Dans ce type d'appariement, un résidu adénosine est souvent retrouvé sur l'ARNm en face de la position 1 du miRNA, et un résidu adénosine ou uracile est souvent retrouvé en face de la position 8 (**Figure 14B-1**). Selon Brennecker, un appariement de 7 nucléotides au niveau de la séquence « seed » en 5' sans appariement en 3' peut être suffisant pour réprimer un gène cible (Brennecke et al., 2005). Les miRE de type marginal semblent être moins fonctionnels car il existe seulement un appariement de 6 nucléotides aux positions 2 à 7 (Site 6 mer) ou avec un décalage de 3 à 8 (Site 6 mer décalage) (Bartel, 2009). Selon Agarwal et al, le type d'appariement le plus conservé et le plus efficace est le 8 mer, suivi par le 7 mer-m8 puis le 7 mer-A1 et enfin le 6 mer (Agarwal et al., 2015). De plus, Il existe d'autres types d'appariement tels qu'un appariement supplémentaire en 3' du miARN (3-4 paire de base) ou un appariement compensatoire en 3' du miARN à la suite d'un mésappariement d'un ou 2 nucléotides du côté 5' (**Figure 14B-2**). En outre, il a été rapporté que dans certains cas, les miARNs ont besoin d'un appariement central de 11 nucléotides minimum d'affilée ou même plus étendu pour pouvoir réprimer l'ARNm cible (Bartel, 2009; Filipowicz et al., 2008; Shin et al., 2010). C'est ce type d'appariement « central et étendu » qui a été rapporté pour le miR-21 qui est capable de réprimer plusieurs gènes dans les cellules HeLa (Shin et al., 2010) ou pour le miR-196a, qui réprime l'expression de HOXB8 dans les embryons de souris (Yekta et al., 2004). Néanmoins, l'efficacité répressive de ces sites non-canoniques reste largement discutée (Agarwal et al., 2015).

A. Schéma l'interaction miARN-ARNm (D'après Filipowicz et al., 2008)

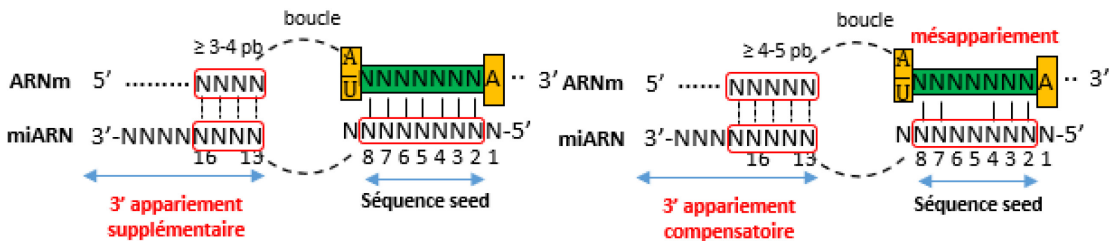


B. Différents types d'appariement (D'après Bartel, 2009, Shin et al., 2010)

(1). Sites canoniques et Sites marginaux



(2). Site 3'-supplémentaire et Site 3'-compensatoire



(3). Autres

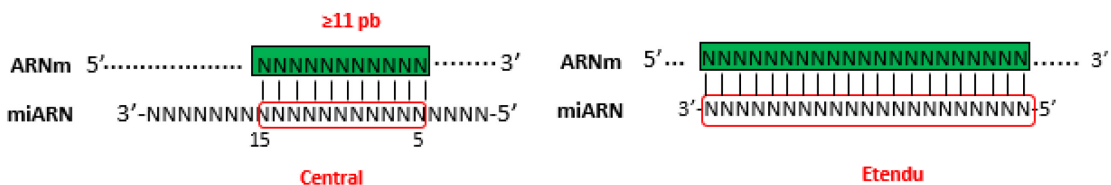


Figure 14 : Interaction miARN-ARNm

D'autres éléments influençant l'accessibilité à l'ARNm cible*L'environnement autour du site de liaison avec la séquence seed du miARN*

En dehors de la complémentarité, l'accessibilité à la séquence cible est influencée par la localisation du site de liaison au sein de la séquence de la région 3'-UTR et par l'environnement autour de ce dernier qui joue également un rôle très important dans la répression des gènes cibles (Grimson et al., 2007). Selon Grimson et al, l'efficacité de la répression sera plus importante si le site de liaison se situe

soit au moins à 15 nucléotides du codon stop ou s'il est proche du codon stop ou de la queue poly(A) pour les régions 3'-UTR longues ; soit qu'il se trouve dans une région riche en Adénosine-Uridine ou d'autres éléments structuraux facilitant l'accessibilité à l'ARNm ; enfin il peut coexister des sites de fixation d'autres miARNs. La région 3'-UTR d'un ARNm peut présenter plusieurs sites de reconnaissance de miARNs, suggérant qu'un ARNm cible pourrait ainsi être régulé par plusieurs miARNs simultanément (Doench and Sharp, 2004).

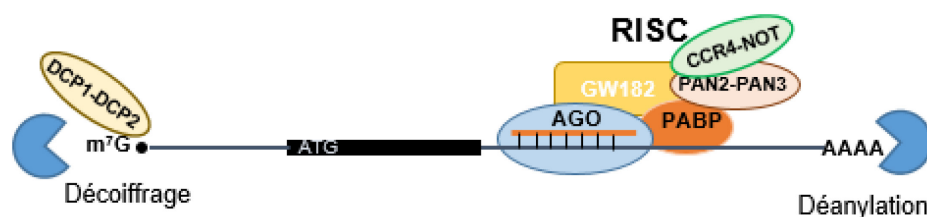
L'énergie libre de l'appariement miARN/ARNm et Structure secondaire de l'ARNm

L'appariement d'un miARN à un ARNm cible se déroule en deux étapes. Premièrement, le miARN établit une courte liaison sur une région accessible de l'ARNm, ensuite ce dernier change de structure secondaire au fur et à mesure pour que le miARN continue sa liaison. Par conséquent, la probabilité qu'un ARNm soit une cible d'un miARN donné, dépend d'une part de l'énergie libre de l'appariement miARN/ARNm, d'autre part, de l'ouverture de cette structure secondaire dans sa région 3'-UTR afin de rendre le site cible accessible (Long et al., 2007).

4.5.2. Désadénylation et dégradation de l'ARNm

Les ARNm sont protégés de la dégradation par les exonucléases par : (1) la présence d'une queue poly(A) au niveau de l'extrémité 3', (2) la présence d'une coiffe m7G à l'extrémité 5' et (3) par la structure refermée de l'ARNm qui se fait grâce aux protéines PABP cytoplasmique (*Poly(A)-Binding Protein*) et eIF (*eukaryotic Initiation Factor*) reliant les deux extrémité 3' et 5' par interaction directe (Pasquinelli, 2012). Afin de réprimer un ARNm, le complexe miRISC déstabilise ce dernier en recrutant, *via* la protéine GW182, les complexes de désadénylases CCR4-NOT1 et PAN2-PAN3 qui éliminent la queue poly(A) en 3' de l'ARNm cible (Behm-Ansmant et al., 2006; Fabian et al., 2011). La fixation de CCR4-NOT déstabilise alors l'interaction entre PABP et la queue poly(A). La protéine NOT interagit alors directement avec la désadénylase CAF-1, responsable de la désadénylation de la queue poly(A) de l'ARNm cible. Ainsi, l'ARNm, ayant perdu sa structure circulaire, peut alors être dégradé par des exosomes cytoplasmiques spécifiques, qui agissent en 3'- 5'. L'ARNm cible peut être dégradé également par le décoiffage de son extrémité 5' *via* le recrutement des protéines DCP1 et DCP2 (*Decapping Protein*) (Behm-Ansmant et al., 2006). Cette fois-ci, ces complexes induisent la dégradation de l'ARNm cible par les exonucléases spécifiques XRN1 (*ExoRibonuclease 1*) qui agissent en 5'-3'. En outre, il existe un cas exceptionnel où un miARN présentant un appariement parfait de son « seed » avec sa cible, la structure double brin induite par l'interaction miARN-ARNm est directement clivée par l'activité endonucléase d'AGO2 (Meister et al., 2004; Yekta et al., 2004).

A. Dégradation de l'ARNm



B. Inhibition de la traduction

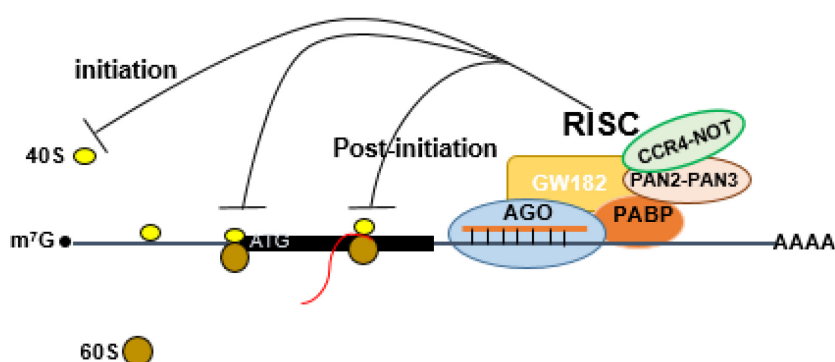


Figure 15 : Mécanismes de répression des miARN

(D'après Fabian and Sonenberg, 2012)

4.5.3. Inhibition de la traduction

L'inhibition de la traduction peut avoir lieu au moment de l'initiation à la traduction, ou après son initiation (**Figure 15**) (Fabian and Sonenberg, 2012; Pasquinelli, 2012). L'initiation de la traduction est dépendante du recrutement de la protéine PABP au niveau de la queue poly(A) sur l'ARNm cible. Elle est alors capable d'interagir avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G, eIF4E et eIF4A, qui sont recrutés au niveau de la coiffe 5' de l'ARNm. La structure refermée de l'ARNm est non seulement essentielle pour sa stabilité mais aussi pour initier la traduction par les sous-unités ribosomales et/ou favoriser le recrutement des ribosomes lors de la phase d'élongation de la traduction. Les protéines AGO, dans le complexe RISC, peuvent rentrer en compétition directement avec les protéines liant la coiffe (cap binding proteins, CBP), comme le facteur d'initiation *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E), et induire une inhibition de l'initiation de la traduction en empêchant l'ARNm de se circulariser et le recrutement des ribosomes (Mathonnet et al., 2007). Le complexe miRISC, *via* l'interaction de GW182, recrute le complexe de désadénylation CCR4-NOT, qui provoque la dissociation de PABP, ainsi la perte de la structure refermée qui empêche l'initiation de la traduction de l'ARNm.

Quand la traduction est initiée, le complexe miRISC peut également réprimer l'élongation et la terminaison de la traduction par l'inhibition de l'assemblage du ribosome due au recrutement du facteur *eukaryotic translation initiation factor 6* (eIF6), ou par la mise en compétition avec les facteurs d'élongation (Chendrimada et al., 2007; Mathonnet et al., 2007). Des miARNs ont été retrouvés associés à des polyribosomes, preuve qu'ils peuvent aussi cibler des ARNm en cours de leur traduction (Maroney et al., 2006; Pasquinelli, 2012). C'est l'exemple de l'étude menée par Nottrott et al qui a montré que let-7 interfère avec l'accumulation de polypeptides en formation (Nottrott et al., 2006).

4.5.4. Dynamique d'action

Il a été rapporté que l'action répressive d'un miARN peut dépendre de la complémentarité des bases : si l'appariement est partiel, le miARN bloquera la traduction de l'ARNm cible, à l'inverse, si l'hybridation est parfaite, l'ARNm sera clivé puis dégradé. Cependant, des études récentes ont montré que malgré la complémentarité imparfaite, le mécanisme d'action majoritaire des miARNs dans les cellules de mammifères peut induire la dégradation des ARNm, associée ou non à une inhibition de la traduction (Pasquinelli, 2012). En particulier, l'action répressive d'un miARN donné a lieu de façon dynamique selon le contexte cellulaire. Selon des documents différents, ces deux mécanismes des miARNs dans l'inhibition de la traduction ou par dégradation des ARNm pourraient être séquentiels : la dégradation des ARNm pourraient être conséquence du blocage de la traduction ou inversement la déadénylation pourrait entraîner une inhibition du blocage de la traduction ; ou au contraire indépendants l'un de l'autre (Bartel, 2018; Fabian and Sonenberg, 2012). De plus, l'équipe de Morozova, par l'établissement d'un modèle mathématique regroupant toutes les données disponibles dans la littérature sur les modes d'action des miARN et leur combinaison, a montré que les mécanismes des miARNs peuvent potentiellement également avoir lieu simultanément (Morozova et al., 2012).

4.5.5. Effet de la présence de plusieurs sites de liaison aux miARNs

Selon l'étude de Grimson et de ses collègues, 75% des transcrits réprimés possèdent plusieurs sites canoniques de type 7-8 mer au niveau de leur 3'-UTR (Grimson et al., 2007). La présence de plusieurs séquences de reconnaissance des miARNs au sein d'une même région 3'-UTR assurent une répression plus efficace (Doench and Sharp, 2004). La distance entre deux sites de reconnaissance des miARNs intervient dans leurs effets synergiques : deux sites de liaison proches (espacé de 10-40 nucléotides) peuvent favoriser l'action coopérative des miARNs. A l'inverse, ils ne peuvent pas fonctionner de

manière coopérative lorsque la distance est trop proche (< 4-6 nt) ou trop espacée (> 56 nt) (Grimson et al., 2007).

4.5.6. Action complexe en réseau

Les miARNs peuvent agir de façon complexe en réseau. Un miARN donné peut en effet réguler plus d'une centaine de cibles (Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008). En parallèle, un transcrite est généralement ciblé par plusieurs miARNs d'une même famille ou de plusieurs familles. De plus, les miARNs peuvent collaborer avec d'autres partenaires comme des protéines de liaison à l'ARN pour moduler l'expression des gènes cibles. Les interactions miARN/ARNm cible constituent donc un réseau complexe qui dépend du contexte cellulaire, et en particulier de la quantité respective de miARNs et de transcrits cibles qui n'est pas si facile à quantifier.

4.5.7. Effet tampon dans les processus biologiques

Certaines études ont mis en évidence que la délétion de certains miARNs individuels dans le génome a rarement des conséquences phénotypiques marquées (Miska et al., 2007). Une explication de cette observation repose sur le partage de la même séquence « seed » par de nombreux miARNs en cluster ou en famille ce qui induit une grande redondance dans la fonction de répression (Ebert and Sharp, 2012). Ainsi la mutation ponctuelle d'une séquence « seed » d'un miARN donné dans la famille n'abolit pas nécessairement l'effet sur ses gènes cibles. De plus, dans leur revue, Ebert et Sharp a indiqué que les miARNs exercent un « effet tampon » en réponse de la fluctuation de réseau de régulation complexe et hautement interconnecté des gènes. En effet, l'effet répressive d'un miARN n'est généralement que de 40 % au mieux par rapport à l'absence de l'implication du miARN (Osella et al., 2011). En effet, l'action de miARN donné n'a pas lieu isolement mais dans un réseau plus large de régulations. De plus, il y a la production en continue des protéines de ses gènes cibles. Ainsi, il n'est pas illogique de penser que l'effet d'un miARN donné sur une cible potentielle sera relativement faible.

4.6. Dialogues croisés entre les protéines de liaison à l'ARN et les miARNs

Il a été rapporté que dans un réseau complexe de régulation, il existe des dialogues croisés entre les protéines de liaison à l'ARN (RBPs) et les miARNs dans la mesure où ces deux classes de régulateurs ciblent la même région 3'-UTR et partagent les mêmes mécanismes d'action de déstabilisation de l'ARNm cible (désadénylation, décoiffage et dégradation de l'ARNm par des enzymes exonucléasiques)

(Jiang and Coller, 2012). La **Figure 16** illustre trois exemples d'interaction entre RBP-miARN qui se fixent sur la même région 3'-UTR de l'ARNm (Jiang and Coller, 2012) : les régions 3'-UTR des gènes sont indiquées par des flèches noires ; (A) Les sites de fixation rapprochés favorisent l'effet synergique (B) ; la compétition entre deux sites de liaison peut altérer l'action répressive du miARN ; (C) la RBP interagit physiquement avec AGO ce qui facilite l'appariement des séquences entre l'ARE de la partie 3'-UTR et les parties de la séquence mature comme cela a été décrit pour le miR-16 (Jiang and Coller, 2012).

Il existe plusieurs travaux qui mettent en évidence la relation entre ces deux régulateurs post-transcriptionnels.

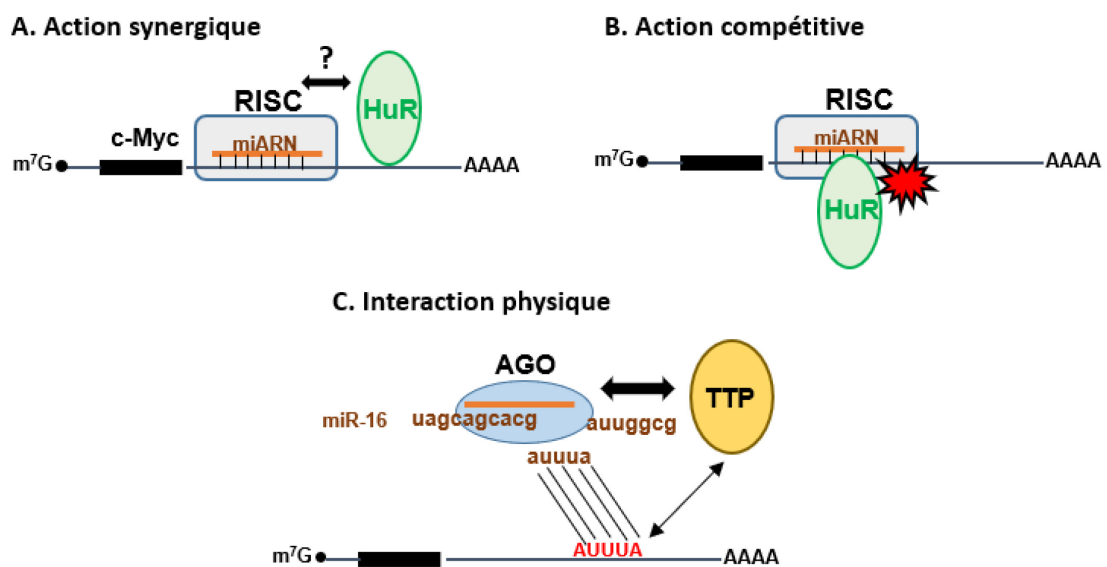


Figure 16 : Modèle de liaison combinatoire entre RBP-miARN sur la région 3'-UTR des ARNm

(D'après Jiang and Coller, 2012)

Action synergique

Les RBPs elles-mêmes peuvent recruter des complexes de désadénylation et entraîner la dégradation du transcrite cible. De plus, la liaison des RBP aux ARNm peut majorer l'action répressive des miARNs soit par facilitation de l'interaction du duplex miARN/ARNm soit par stabilisation de l'activité du miARN dans le complexe RISC. Les RBPs peuvent faciliter la reconnaissance du site de liaison des miARNs comme cela a été rapporté pour la RBP Pumilio et miR-410 (Leibovich et al., 2010). La RBP Pumilio peut aider le transcrite p27^{Kip1} (un inhibiteur de kinase dépendant de la cycline) à accéder au complexe RISC avec le miR-221/222 (Kedde et al., 2010). Par ailleurs, il a été démontré que le miR-16 reconnaît spécifiquement des séquences ARE du transcrite TNF α et entraîner sa dégradation grâce au recrutement

de la RBP TrisTetraPolin (TTP) (Jing et al., 2005). Ces auteurs ont montré également l'interaction physique entre TTP et le complexe RISC.

Action compétitive

Les RBPs peuvent rentrer en compétition avec les miARNs pour les sites de fixation sur l'ARNm cible. C'est le cas de Dnd1 qui inhibe l'accessibilité du miR-430 dans le complexe RISC, prévenant ainsi la dégradation de ses gènes cibles dans les cellules germinales chez les poissons zèbres (Kedde et al., 2007). La fixation de Dnd1 induit un changement de la structure secondaire de l'ARNm cible rendant inaccessibles les sites de reconnaissance aux miARNs. Les RBPs peuvent aussi empêcher son assemblage en déplaçant le miRISC de l'ARNm. D'autres protéines peuvent interférer avec l'interaction entre les différents composants du miRISC et les partenaires responsables de la répression de la traduction ou de la désadénylation. Dans les cellules d'hépatocarcinome humain Huh-7, le miR-122 inhibe la traduction de l'ARNm CAT1 (*cationic amino acid transporter 1*). Si ces cellules sont soumises à un stress, la quantité de la RBP HuR augmente dans le cytoplasme. La fixation dans la région 3'-UTR du complexe miRISC et de la protéine HuR étant en compétition, HuR en s'associant à l'ARNm CAT1 réactive sa traduction (Bhattacharyya et al., 2006).

Importance du contexte cellulaire

Une RBP peut agir soit en favorisant soit en empêchant la répression par le miRISC selon le transcrit ou le contexte cellulaire. Les travaux de Kim et de ses collaborateurs ont montré que HuR se lie à la région 3'-UTR de MYC et facilite l'interaction de let-7 avec cet ARNm (Kim et al., 2009). Selon Srikantan et al, la distance entre les deux sites de liaison étant assez proche (100 nt), HuR entraîne un changement conformationnel facilitant l'accès de let-7 à sa séquence cible (Srikantan et al., 2012). A l'inverse, l'augmentation des niveaux intracellulaires de HuR diminue l'interaction entre le miR-548c-3p et l'ARNm de TOP2A (*Topoisomerase II alpha*) et inverse l'effet du miARN sur l'expression de TOP2A (Srikantan et al., 2011).

4.7. Sécrétion et libération des miARNs dans le milieu extracellulaire

Les miARNs sont présents non seulement dans les cellules et les tissus, mais ils peuvent aussi se retrouver dans tous les liquides biologiques. La présence des miARNs dans les liquides biologiques a été mise en évidence pour la première fois en 2008 par Chim et al qui ont démontré que des miARNs d'origine placentaire ont été détectés au niveau du plasma maternel (Chim et al., 2008). Ensuite, Weber et al ont trouvé des miARNs dans 12 types de fluides corporels tels que le plasma, les urines, le liquide céphalo-rachidienne, le liquide amniotique, le lavage bronchial, le liquide d'épanchement

pleural, le liquide péritonéal, les larmes, la salive, le lait maternel, le colostrum et aussi le liquide séminal (Weber et al., 2010).

Les formes sécrétées et mécanismes de sécrétion des miARNs extracellulaires

Le transfert des miARNs dans le milieu extracellulaire s'effectue selon différents mécanismes et sous différentes formes. La **Figure 17** illustre les mécanismes et les formes sécrétées des miARNs extracellulaires (Chen et al., 2012a). Les miARNs peuvent être sécrétés de façon passive à la suite du processus d'apoptose ou de la nécrose cellulaire qui entraîne le relargage non sélectif des miARNs intracellulaires. Ils peuvent être sécrétés de façon active par la cellule sous forme de vésicules extracellulaires comme les microvésicules (allant de 10 à 1 μ m) et les exosomes (allant de 30 à 100 nm) ou sous une forme associée aux lipoprotéines HDL (lipoprotéine de haute densité) et le plus souvent sous forme de complexes ribonucléoprotéiques avec les protéines Argonautes. Environ 90 % des miARNs circulants se trouvent associés aux protéines AGO (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2011). Pourtant, les exosomes constituent une forme de protection contre l'action des RNAses. Ils sont sécrétés par différents types de cellules normales ou pathologiques et sont composés de molécules diverses comme des protéines, des ARN. Les miARNs représentent près de 50 % des ARN totaux vésiculaires totaux. Les exosomes sont relativement stables et protègent les miARNs de la dégradation par les RNAses (Cheng et al., 2014a). L'identification de miARNs dans les exosomes a permis leur utilisation comme biomarqueurs diagnostiques et prédictifs de certaines maladies (Cheng et al., 2014a; Miranda et al., 2010).

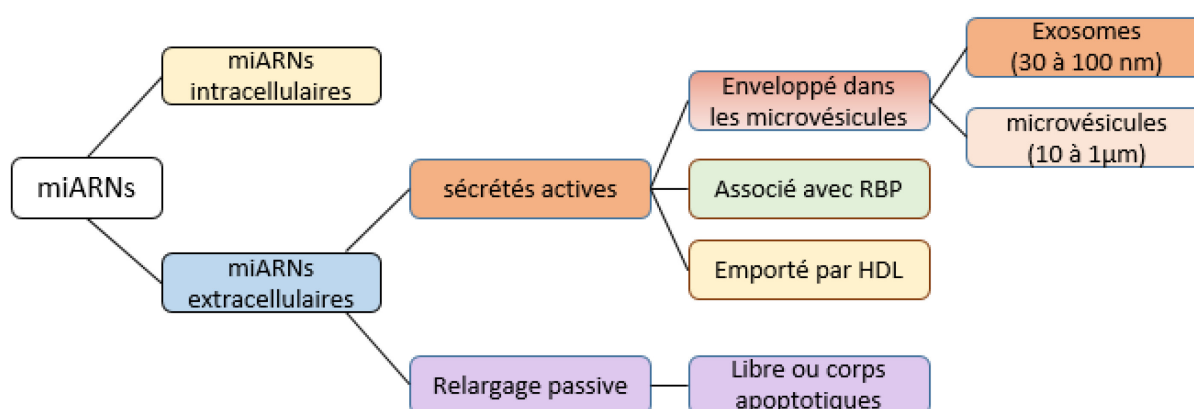


Figure 17 : Les différentes formes des miARN sécrétés dans le milieu extracellulaire.

(D'après Chen et al., 2012)

Effet biologique des miARNs sécrétés

Il a été rapporté que les miARNs extracellulaires, en particulier, les miARNs circulants participent aux communications intercellulaires de façon autocrine, paracrine ou endocrine. Les miARNs sécrétés *via* les microvésicules peuvent être intégrés dans une cellule cible par endocytose, phagocytose ou fusion des membranes plasmiques (Chen et al., 2012b) et peuvent induire un effet biologique de répression de l'expression génique dans la cellule cible (Iguchi et al., 2010). En effet, l'équipe d'Iguchi a démontré que le miR-16 exosomal a été transféré dans les cellules de cancer de la prostate PC-3M par voie sous-cutané chez la souris entraînant la suppression de son gène cible Bcl2 (Iguchi et al., 2010). Valadi et al ont montré également qu'après transfert d'exosomes de souris dans des mastocytes humains, des protéines murines ont été retrouvées dans les cellules receveuses (Valadi et al., 2007). Les exosomes servent donc au transfert d'information (ARNm, virus) ainsi que d'autres matériels (protéine, miARN) entre les cellules. En plus, Vickers et al ont démontré que les miARNs plasmatiques associés aux HDL sont soumis à une endocytose par le SR-BI (le Scavenger Receptor class B type I), un récepteur membranaire aux HDL. Ils sont dirigés vers le cytoplasme où ils exercent leur fonction de régulation des ARNm (Vickers et al., 2011). La présence de molécules d'adressage à la surface des microvésicules et de récepteurs spécifiques sur les cellules cibles permet probablement un adressage spécifique aux cellules cibles. Cela montre que les miARNs sécrétés peuvent avoir un effet paracrine. En outre, certaines études ont indiqué que les exosomes de cellules tumorales seraient capables de participer à distance à la formation des niches pré-métastatiques (Bayraktar et al., 2017).

Stabilité des miARNs extracellulaires

miARNs circulants

La plupart des études ont indiqué que les miARNs circulants sont assez stables grâce à leur petite taille et aux mécanismes de protection contre l'action des RNAses (Gupta Shashi K. et al., 2010). En effet, les grands ARN provenant du sérum ont été rapidement dégradés par la digestion de la ribonucléase, ce qui a illustré la pertinence biologique potentielle des miARNs circulants par rapport des grands ARNs (Chen et al., 2008). En plus, les miRNA synthétiques ajoutés directement aux échantillons de sérum et de plasma ont été rapidement dégradés, ce qui indique que les miRNA endogènes existent sous une forme protégée (Ortiz-Quintero, 2016). Parmi les formes circulantes, certaines études ont montré que les miARNs plasmatiques extraits des exosomes sont plus stables que les miARNs plasmatiques libres (Ge et al., 2014; Köberle et al., 2013; Sanz-Rubio et al., 2018). Pourtant, l'expression des miARNs circulants est influencée par la température et la durée de leur conservation. Il y a pas de consensus dans la décision de la température ou de la durée de conservation des miARNs qui permet de maintenir la meilleure stabilité de l'expression des miARNs circulants. En effet, les travaux de Mraz

et *al* ont indiqué que les miARNs sont stables à la fois dans les tissus et les fluides corporels, lorsqu'ils sont stockés -80°C (Mraz et al., 2009). L'étude de Köberle et *al* a montré que les miARNs sont instables lorsqu'ils sont stockés à 4°C pendant une courte période (Köberle et al., 2013). En revanche, dans l'étude de Mitchell et *al*, les miARNs plasmatiques et sériques résistent à 8 cycles de congélation/décongélation et sont stables pendant 24 h à température ambiante (Mitchell et al., 2008).

miARNs urinaires

Une des premières études, qui a porté sur la stabilité des miARNs libres urinaires a été réalisé par Yun et *al* en 2012. Ces auteurs ont testé si les miARNs libres urinaires pouvaient être utilisés comme biomarqueurs pronostiques et/ou diagnostiques du cancer de la vessie. Ils ont montré qu'après 7 cycles de congélation/décongélation, hsa-miR-145 et hsa-miR-200a ne présentaient que des signes minimes de dégradation (Yun et al., 2012). D'autres études ont démontré avec succès la stabilité des miARNs urinaires, jusqu'à 10 cycles de congélation/décongélation, et différentes températures de stockage allant de 4°C à -80°C pendant des périodes courtes et longues (entre 5 jours et 2 ans) (Lv et al., 2013; Mall et al., 2013).

Dans l'ensemble, les miARNs circulants ou urinaires sont stables. Cette stabilité ouvre la nouvelle voie dans l'application des miARNs dans la recherche et la pratique clinique de certaines maladies humaines.

5. Rôle des miARNs en physiologie et physiopathologie rénale

5.1. Rôle des miARNs en physiologie rénale

Actuellement, un certain nombre des miARNs ont été caractérisés comme étant spécifiques aux reins. Leur rôle a été montré dans l'équilibre de l'homéostasie corporelle et dans le développement rénal (Amrouche et al., 2011; Ma and Qu, 2013; Schena et al., 2014; Trionfini et al., 2015).

En effet, le rôle des miARNs dans le développement rénal a été tout d'abord rapporté par une série d'études portant sur des souris invalidées KO (Knock-out) pour DICER ou Drosha, deux ribonucléases importantes pour la maturation des miARNs. Les souris KO global de DICER meurent précocement au cours du développement embryonnaire (avant le stade E7,5) du fait des altérations de l'apoptose démontrant l'importance de ces facteurs dans le développement. Afin de contrecarrer la létalité précoce associée au phénotype des souris KO, plusieurs groupes ont créé des modèles murins conditionnels inductibles grâce au système Cre-Lox. L'inactivation de DICER dans le bourgeon urétéral

chez la souris conduit à l'arrêt prématuré de la néphrogenèse et à l'apparition de microkystes tubulaires et d'une hydronéphrose dès les trois semaines de développement, ce qui confirme le rôle des miARNs dans le développement de l'épithélium du canal collecteur et de l'urothélium (Pastorelli et al., 2009). Les souris mutantes caractérisées par une délétion conditionnelle de DICER dans les cellules juxta-glomérulaires sécrétrices de rénine, présentaient une diminution du nombre de ces cellules associée à une diminution de l'expression des gènes *Renin1* et *Renin2* et de la concentration plasmatique de rénine, ainsi qu'une baisse de la pression artérielle de 10 mmHg (Sequeira-Lopez et al., 2010). Les souris KO survivent toutefois normalement à l'âge adulte, mais le poids de leurs reins est diminué et ces souris présentent des nombreuses anomalies histologiques rénales vasculaires, glomérulaires et interstitielles et leur taux de créatinine est augmenté. Ces résultats indiquent que les miARNs sont importants pour le développement des cellules juxtaglomérulaires. Pour étudier le rôle des miARNs dans les glomérules, une invalidation de DICER, spécifiquement dans les podocytes, qui sont des cellules épithéliales entourant les capillaires glomérulaires, a été réalisée chez la souris par trois groupes la même année (Harvey et al., 2008; Ho et al., 2008; Shi et al., 2008). Les travaux de Zhdanova ont indiqué que l'invalidation de *Drosha* dans les podocytes induit le même phénotype que la souris KO DICER (Zhdanova et al., 2011). Dans tous les cas, une protéinurie se développe chez les souris KO qui évoluent vers l'insuffisance rénale terminale en quelques semaines. Les podocytes sont hypertrophiés avec des vacuolisations, un effacement des pédicelles, notamment avec une désorganisation du cytosquelette. Il existe également une atteinte glomérulaire et tubulo-interstitielle, sans atteinte des cellules endothéliales et mésangiales. Une analyse transcriptomique a révélé que beaucoup d'ARNm parmi ceux dont l'expression est augmentée dans les glomérules des souris KO sont potentiellement ciblés par les miARNs de la famille miR-30. Les miARNs pourraient donc être impliqués dans le développement de podocytopathies. Toutefois, les phénotypes observés sont liés à l'absence totale de miARNs et ces souris KO n'ont pas permis d'identifier les miARNs spécifiquement impliqués.

Ensuite, certains miARNs spécifiques sont connus pour être impliqués dans le développement rénal. La délétion du cluster miR-17-19 entraîne une réduction du nombre de néphrons et une hypodysplasie rénale, une dysfonction glomérulaire et une protéinurie (Marrone and Ho, 2014). Le rôle du miR-29b dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse *via* l'angiotensine II dans les cellules épithéliales tubulaires a été montré par Pan et al (Pan et al., 2014). Des recherches sur le développement du pronéphros chez le xénope ont démontré que miR-30 régule le développement rénal normal en ciblant *Xlim/Lhx1*, qui est un facteur de transcription essentiel à la formation du canal néphridien et à la différenciation des néphrons (Agrawal et al., 2009). Dans l'étude de Wessely et al, miR-30 a supprimé l'expression de *Lhx1* pendant la formation des tubules épithéliaux rénaux, alors que

le miR-200 a été impliqué dans le processus de transition épithélio-mésenchymateuse en ciblant Slip1/Zeb2/Snail1 (Wessely et al., 2010).

En outre, les miARNs sont également impliqués en physiologie rénale, dans le contrôle de la pression artérielle et le maintien de l'homéostasie des fluides et des électrolytes dans l'organisme. Le rôle des miARNs dans le contrôle de la pression artérielle a tout d'abord été démontrée par son influence sur l'apparition des cellules juxtaglomérulaires qui expriment la rénine, et qui participe à la régulation de la sécrétion de l'aldostérone (Lorenzen et al., 2011; Sequeira-Lopez et al., 2010). Ensuite, les miARNs influencent l'expression des transporteurs d'électrolytes. En effet, le miR-192 réprime l'expression du gène de la sous-unité $\beta 1$ de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dans les cellules épithéliales rénales humaines (Mladinov et al., 2013), et dans le néphron distal, il réprime également l'expression de la sérine/thréonine kinase WNK1, une protéine essentielle à la régulation coordonnée du transport des électrolytes dans le rein (Elvira-Matelot et al., 2010). La régulation du transport du Na^+ par les miARNs a été confirmée dans le canal collecteur cortical de la souris où l'aldostérone réduit l'expression d'un sous-ensemble de miARNs qui cible l'ankyrine 3. En revanche, la surexpression de l'ankyrine 3 augmente le transport de sodium relayé par le canal αENaC (Edinger et al., 2014). Dans une autre étude, l'aldostérone réduit également l'expression du miR-466g dans les cellules du tubule collecteur cortical et la surexpression de ce miARN, à son tour, régule l'expression de SGK1 et l'activité d'ENaC (Jacobs et al., 2016). De plus, les cellules du canal collecteur cortical médullaire rénal, exposées à une concentration élevée de Na^+ , voient leur niveaux de miR-200 et miR-717 diminuer avec une augmentation concomitante de leur cible commune NFAT5 (Huang et al., 2011), qui contrôle la réponse cellulaire au stress osmotique. Les miARNs sont également capables de réguler la sécrétion de K^+ . En effet, dans le canal collecteur cortical, un apport élevé en K^+ alimentaire stimule la transcription des miR-802 et miR-194, qui régulent l'activité du canal ROMK en ciblant respectivement la cavéoline-1 (un régulateur négatif du canal ROMK) (Lin et al., 2011) et l'intersectine-1 (impliquée dans l'endocytose du canal ROMK induite par WNK1) (Lin et al., 2014). Enfin, dans la branche ascendante large de l'anse de l'Henlé, les miR-9 et miR-374 régulent l'expression de la claudine-14, qui est essentielle à la réabsorption du Ca^{2+} dans le rein (Gong et al., 2012). Il est intéressant de noter que les niveaux de transcription de ces deux miARNs sont directement régulés par le récepteur CASR sensible au Ca^{2+} CASR (Negri, 2015).

En résumé, toutes ces études, réalisées *in vitro* et *in vivo*, confirment l'implication des miARNs dans le développement rénal et la physiologie rénale surtout dans le contrôle de l'équilibre de la balance hydro-électrolytique.

5.2. Dérèglement de l'expression des miARNs dans certaines pathologies rénales

Actuellement, de nombreuses études ont exploré l'implication des miARNs et leur rôle dans diverses maladies, en particulier les néphropathies (Ma and Qu, 2013; Mukhadi et al., 2015; Schena et al., 2014; Trionfini et al., 2015). Dans la revue de Ma et al, il a été décrit de façon schématique le dérèglement de l'expression de certains miARNs ainsi que leurs gènes cibles dans différentes formes de maladies rénales (**Figure 18**) (Ma and Qu, 2013).

Dans ce travail, les auteurs ont précisé le profil d'expression des miARNs. Dans **la néphropathie à Immunoglobuline A (IgA)**, le type le plus courant de glomérulonéphrite primaire, on retrouve la surexpression du miR-142-5p, miR-155, miR-223 et en parallèle la sous-expression du miR-210, miR-30c-3p, let-7c. Dans **la néphropathie lupique**, une manifestation fréquente et grave du Lupus érythémateux systémique, l'expression des miARNs miR-886-3p, miR-142-3p, miR-23a, miR-372-5p, miR-423-5p, miR-638, miR-198, miR-146a, et de miR-663 sont induites dans les prélèvements de biopsie rénale alors que celle des miR-342-3p, miR-328-5p, et de miR-1224-3p sont réprimées.

D'autre part, les auteurs ont précisé les gènes cibles et la voie de signalisation ciblée par ces miARNs dans différentes néphropathies. **La néphropathie diabétique (Diabetic Nephropathy ou DN)** est une des complications graves du diabète sucré. La pathogenèse de la DN est étroitement liée à l'hyperglycémie et à l'augmentation du TGF- β 1 (Transformant Growth Factor β 1 (TGF- β 1), qui est également induit par l'hyperglycémie. L'expression de multiples miARNs est régulée par l'hyperglycémie et le TGF- β 1, responsable d'un dépôt excessif de collagène et d'une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire. Le miR-192 a été le premier miARN identifié comme étant régulé par le TGF- β 1, qui induit l'expression du gène *Col1a2* en supprimant *SIP1* (Kato et al., 2007). Outre le miR-192, l'expression de plusieurs autres miARNs est induite par l'hyperglycémie ou le TGF- β 1 (Dehwah et al., 2012), parmi lesquels miR-21, miR-214, miR-216a, miR-217, miR-377, miR-382 et miR-491-5p alors que l'expression des miARNs appartenant à la famille de miR-29 et miR-200 est diminuée. L'équipe de Du et al a validé que l'expression du miR-29a est réduite par l'hyperglycémie et le TGF- β 1, et que le miR-29a régule négativement l'expression du gène codant le collagène IV (Col IV) en se liant directement à sa région 3'-UTR (Du et al., 2010). Enfin, l'expression des membres de la famille miR-30 est diminuée pendant ce processus indiquant que ces miARNs pourraient servir d'inhibiteurs de la fibrose rénale (Ma and Qu, 2013).

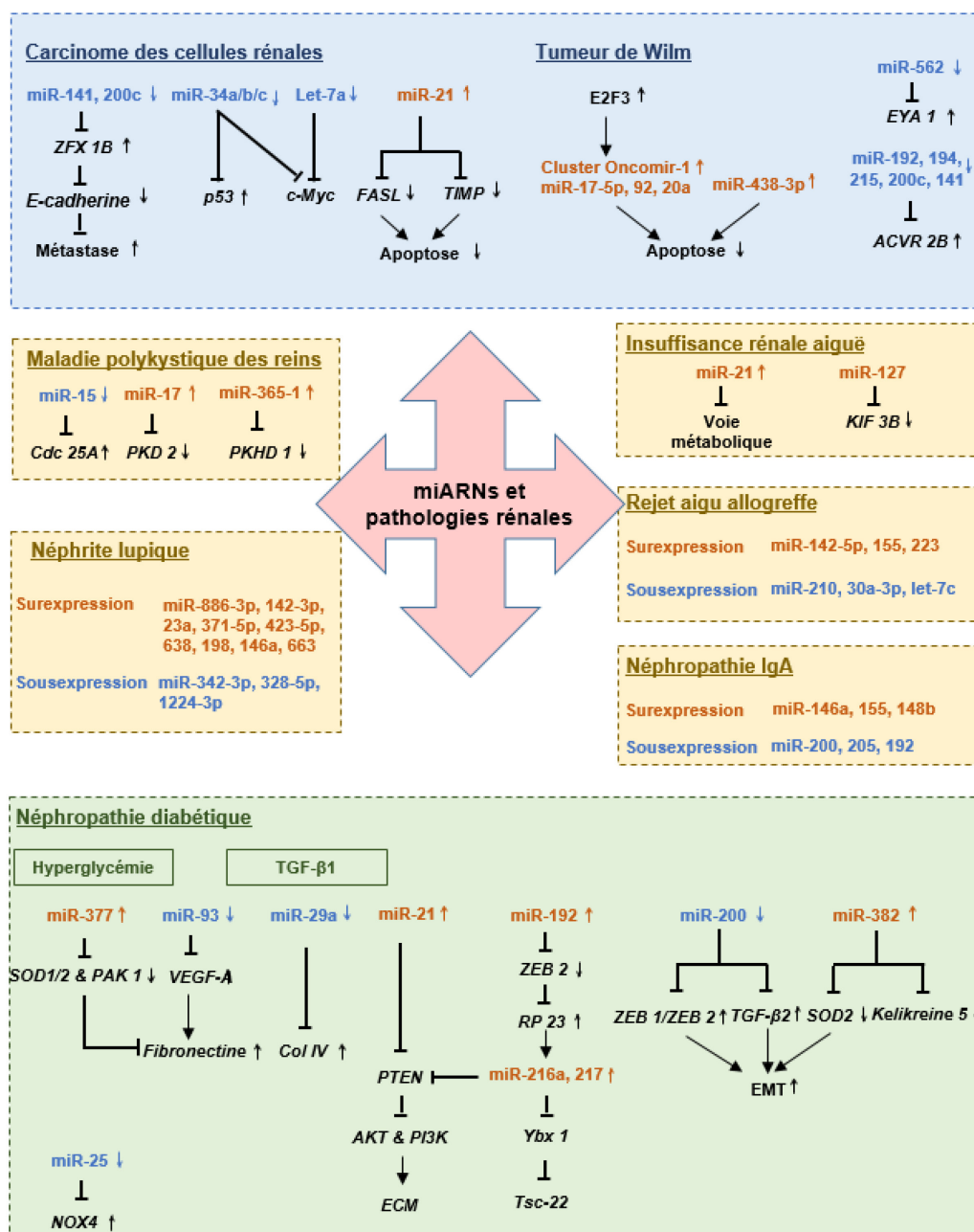


Figure 18 : Implication des miARNs dans différentes néphropathies

(D'après Ma and Qu, 2013)

La maladie polykystique des reins (*PKD*, *Polykystic Kidney Disease*) est une maladie héréditaire connue par la formation aberrante de kystes provoquant l'hypertrophie rénale. L'expression du miR-15a est réduite dans la PKD alors que son gène cible *Cdc 25A* est surexprimé avec pour conséquence la cystogenèse hépatique dans un modèle de rat atteint PKD (Lee et al., 2008). Le miR-17 favorise la prolifération cellulaire par la répression de l'expression du gène *PKD 2* dans les cellules HEK 293T (Sun et al., 2010) alors que la RBP Bicc1 (bicaudal C), en inhibant l'activité répressive du miR-17, augmente

la stabilité et l'efficacité de la traduction de l'ARNm *PKD 2* (Tran et al., 2010). Récemment, il a été montré que miR-365-1 inhibe l'expression du gène *PKHD 1* et supprime l'adhérence cellulaire dans la PKD (Duan et al., 2012).

Le Carcinome à cellules rénales (CCR) est la forme prédominante de cancer du rein chez les adultes (Chow et al., 2010). Plusieurs études ont comparé les profils d'expression des miARNs entre le CCR et les tissus rénaux normaux et montré qu'ils jouent des fonctions importantes dans la tumorigenèse et les métastases rénales. L'expression de miR-141 et de miR-200c est réprimée dans le CCR, avec la surexpression de leur cible commune *ZFHX 1B* qui conduit à l'altération de la transcription de *CDH 1/E-cadhérine* (Nakada et al., 2008). L'expression de miR-34a/b/c est inactivée par la méthylation des îlots CpG dans la région du promoteur, ce qui augmente l'expression de p53 (Vogt et al., 2011) et de c-Myc (Yamamura et al., 2012) dans le CCR. Le miR-21 inhibe l'apoptose dans les cellules du CCR en ciblant *FASL* et *TIMP 3* (Zhang et al., 2011), et l'induction de miR-21 est corrélée à une baisse du taux de survie du cancer du rein (Zaman et al., 2012). Par ailleurs, le miR-92 régule l'expression du gène *VHL* (Valera et al., 2011), et le miR-210 dont l'expression est induite par HIF1a (facteur inductible par l'hypoxie 1a) supprime l'expression d'*E2F3* au cours de la progression du CCR (Nakada et al., 2011). Enfin, le Let-7a agit en tant que suppresseur de tumeur en ciblant c-Myc, et amplifie les effets de l'inhibition de la prolifération et l'arrêt du cycle cellulaire en modulant les gènes cibles en aval de c-Myc (Liu et al., 2012).

La tumeur de Wilms (WT), également appelée néphroblastome) est un type de cancer fréquent chez l'enfant et plus rare chez l'adulte. L'analyse des signatures d'expression des transcrits a révélé que l'expression du facteur de transcription E2F3 est augmentée et que l'oncomir-1 (un groupe oncogène de miARNs) est activé par E2F3 dans les échantillons de tumeurs de Wilms (WT) (Kort et al., 2008). En outre, l'expression du miR-562 est diminuée dans les échantillons WT, ce miARN stimule l'expression d'*EYA 1* (Drake et al., 2009). La surexpression du miR-483-3p a été observée dans la plupart des échantillons WT, qui joue un rôle protecteur des cellules contre l'apoptose (Veronese et al., 2010). Il a été démontré que ce miARN pourrait réprimer BBC3/PUMA, un des gènes pro-apoptotiques. L'expression de trois miARNs spécifiques au rein (miR-192, miR-194 et miR-215) et de deux membres de la famille miR-200 (miR-200c et miR-141) étaient significativement diminuées dans les WT. Ces miARNs sont impliqués dans la voie du TGF- β par la régulation de leur cible commune *ACVR 2B* (Senanayake et al., 2012).

Enfin, le profil d'expression des miARNs a été exploré dans **l'insuffisance rénale aiguë (IRA)**. Chez les souris C57BL/6 souffrant d'insuffisance rénale aiguë, provoquée par une ischémie et une reperfusion, l'expression rénale de 9 miARNs, parmi lesquels miR-21, miR-20a, miR-146a, miR-199a-3p, miR-214,

miR-192, miR-187, miR-805 et miR-194, sont exprimés de façon différentielle par rapport aux souris contrôles normales (Godwin et al., 2010). Parmi eux, le miR-21 stimule la fibrose rénale en réduisant des gènes impliqués dans des voies métaboliques, en particulier la voie du métabolisme lipidique régulée par le récepteur PPAR α (Chau et al., 2012), alors que trois autres miARNs (miR-126, miR-296 et miR-127) ont des effets protecteurs dans les cellules tubulaires au cours de l'IRA (Aguado-Fraile et al., 2012).

En conclusion, l'exemple de ces travaux montre que l'étude de l'expression des miARNs dans différentes maladies rénales est véritablement un outil précieux pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques, diagnostiquer ces maladies et développer de nouvelles options thérapeutiques.

5.3. Les miARNs : Biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de certaines maladies rénales

La majorité des miARNs sont présents dans le cytoplasme des cellules de façon tissu-spécifique mais de nombreux miARNs sont aussi retrouvés dans les liquides biologiques (le plasma, l'urine) (Weber et al., 2010). Leur profil d'expression dans les liquides biologiques s'est avéré hautement spécifique en fonction de la pathologie. Par ailleurs, il a été démontré que les niveaux de ribonucléases circulantes sont influencés par la fonction rénale (Karpetsky et al., 1977). On pourrait supposer que l'altération de l'activité ribonucléasique plasmatique est corrélée à la fonction rénale, ce qui pourrait conduire à la dégradation des miARNs circulants. Cependant, étant donné que les miARNs sont généralement liés à des protéines AGO ou encapsulés dans des microvésicules/exosomes dans la circulation, ils sont protégés contre la dégradation par les ribonucléases (Lorenzen and Thum, 2012; Valadi et al., 2007). Ainsi, la quantification des miARNs circulants ou urinaires pourrait faciliter l'identification de nouveaux biomarqueurs non invasifs de diagnostic et de pronostic de certaines pathologies rénales.

Les miARNs plasmatiques ou sériques dans les néphropathies

Les données sur les miARNs circulants dans les maladies rénales sont encore très limitées. Chez les patients atteints de maladies rénales, les études actuelles ont simplement montré une association avec l'évolution de la maladie (Lorenzen and Thum, 2012). En plus, il existe une forte hétérogénéité entre les études sur le profil d'expression des miARNs circulants dans certaines maladies rénales (Sun and Lerman, 2019). L'exploration des miARNs plasmatiques ou dans le sérum de patients atteints du cancer du rein est un bon exemple. Parmi les 36 miARNs dont l'expression est induite dans les tissus et le sérum de patients porteurs d'un cancer du rein, Wulfken et al (Wulfken et al., 2011) ont identifié

seulement que l'expression du miR-1233 circulant diffère par rapport au groupe contrôle, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un biomarqueur potentiel pour les patients atteints de cancer du rein. Néanmoins, il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'expression de ce miARN circulant et les paramètres clinico-pathologiques. Dans une autre étude, de faibles niveaux d'expression de miR-508-3p et miR-509-3p ont été rapportés dans le plasma et dans les échantillons de tissus rénaux cancéreux de patients atteints de cancer du rein (Zhai et al., 2012). La surexpression de ces miARNs *in vitro* diminue la prolifération des cellules du cancer du rein, induit l'apoptose des cellules et inhibe la migration cellulaire. Ces résultats suggèrent que les miR-508-3p et 509-3p jouent un rôle important en tant que modulateurs dans la formation des tumeurs et qu'ils peuvent être considérés comme de nouveaux biomarqueurs diagnostiques pour le cancer du rein. En outre, il existe quelques études sur les miARNs circulants dans l'insuffisance rénale aiguë et chronique. Lorenzen et al ont identifié 13 miARNs dont l'expression est altérée dans le sérum de patients atteints d'insuffisance rénale aiguë (IRA) (Lorenzen et al., 2012). Parmi les trois miARNs quantifiés, l'expression de miR-16 et miR-320 étaient réprimées, tandis que l'expression du miR-210 était induite, miR-210 était un facteur prédictif fort de la survie chez les patients atteints d'IRA sévère. Chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC), l'expression de miR-16, miR-21, miR-155, miR-210 et miR-638 sont corrélées avec la fonction rénale (Neal et al., 2011). Cependant, dans cette étude, les niveaux circulants de certains miARNs étaient réduits chez les patients atteints d'IRC sévère par rapport aux individus présentant une insuffisance rénale légère ou nulle, ce qui démontre l'hétérogénéité des miARNs circulants en tant que biomarqueurs chez les individus présentant une atteinte rénale sévère. Ainsi, de futures études sont nécessaires pour préciser le rôle causal des modifications de la fonction rénale par ces miARNs circulants.

Un obstacle dans l'analyse des miARNs circulants est d'utiliser une méthode de normalisation appropriée. En raison du faible niveau d'expression des miARNs dans le sang circulant, la normalisation est de la plus haute importance. Actuellement, il n'y a pas de consensus sur la technique de normalisation. Plusieurs groupes ont utilisé le spike-in de miARN pour la normalisation. Ce sont des miARNs synthétiques de *C. elegans* (par exemple, miR-39, miR-54 et miR-238) qui sont ajoutés aux échantillons après l'étape de dénaturation du plasma/sérum pendant l'extraction de miARN. D'autres groupes ont utilisé un doublet et un triplet de miARNs comme normalisateurs.

En outre, le temps nécessaire à l'analyse des miARN circulants représente un obstacle à leur utilisation clinique (Lorenzen and Thum, 2012). En fonction de la pathologie étudiée (par exemple, l'infarctus aigu du myocarde ou rejet aigu d'allogreffe rénale), la situation clinique exige une décision thérapeutique immédiate. Un test au lit du patient remplaçant la procédure complexe d'isolement de l'ARN et de la RT-qPCR quantitative ouvrirait la voie à l'application des miARNs circulants en clinique.

Les miARNs urinaires dans les néphropathies

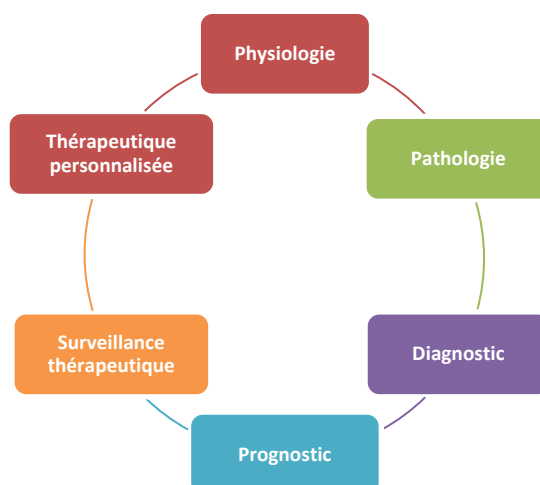


Figure 19 : Utilisation potentielle des miARNs urinaires dans les maladies rénales

(D'après Sun and Lerman, 2019)

Les miARNs urinaires semblent être étudiés de façon plus importante dans les maladies rénales par rapport aux miARNs plasmatiques ou sériques probablement à cause du caractère moins invasif de cette exploration. Les miARNs urinaires peuvent être sécrétés par toutes les cellules du système urinaire, ou ultrafiltrés à partir du plasma par la membrane glomérulaire. Bien que leur validité en tant que biomarqueurs des maladies rénales n'ait pas été encore totalement établie, des études de l'analyse des miARNs urinaires ont tenté de détecter et/ou de surveiller l'évolution des maladies rénales aiguës et chroniques. Les miARNs peuvent faciliter le diagnostic et la surveillance des affections rénales. Leur application la plus utile pourrait être de prédire le résultat clinique des patients souffrant d'une maladie rénale aiguë ou chronique et d'aider à la décision thérapeutique.

Si les miARNs circulants plasmatiques ou sériques se présentent sous différentes formes, les miARNs urinaires sont connus principalement sous forme libre ou incorporée aux vésicules extracellulaires (Cheng et al., 2014b; Lorenzen et al., 2012). Les vésicules extracellulaires semblent protéger et augmenter la stabilité des miARNs, alors que la stabilité des miARNs libres reste controversée. Par rapport aux miARNs plasmatiques ou sériques, les miARNs urinaires sont beaucoup moins abondants. Cela est très probablement dû à une activité ribonucléasique plus élevée dans l'urine que dans le sérum (Cheng et al., 2014b). Plusieurs travaux montrent que l'expression des miARNs urinaires est corrélée aux dysfonctionnements rénaux et aux processus physiopathologies (Papadopoulos et al., 2015). Dans leur revue, Sun et Lerman a donné un tableau de profil des miARNs urinaires corrélé aux différentes maladies rénales (**Tableau 4**) (Sun and Lerman, 2019). Dans les maladies rénales, les miARNs urinaires

détectés aident à dépister des changements physiologiques ou pathologiques, à diagnostiquer la maladie, à poser un pronostic et à surveiller l'efficacité du traitement et enfin à suggérer une approche thérapeutique optimale pour chaque patient (**Figure 19**). Ainsi, l'analyse spécifique des miARNs vésiculaires dans les urines, notamment dans les exosomes, constitue vraisemblablement une perspective d'un grand intérêt en matière de biomarqueurs en néphrologie.

Maladies	Expression des miARNs urinaires
Lésions d'ischémie-reperfusion	
Chirurgie cardiaque	miR-21 ↗
Transplantation	miR-24 ↗
Unité de soins intensifs	miR-494 ↗
Néphropathie diabétique	miR-15 ↘
Hypertension	
Sensibilité au sel	miR-4516 ↗
Hypertension réno-vasculaire	miR-26 ↘
	miR-21, miR-93, miR-200b ↗
Maladie polykystique des reins	miR-1, miR-133b ↘
Glomérulonéphrite	
Néphropathie à IgA	miR-146a, miR-155 ↗
Glomérulosclérose segmentaire focale	miR-10a, miR-30d ↗
Néphrite lupique	miR-146a ↗
Transplantation rénale	
Rejet aigue médié par les cellules T	miR-210 ↘
Rejet chronique	miR-142-3p, miR-201 ↗
	miR-211 ↘
Obstruction urétérale	Let-7, miR-29b ↘
Cancer	
Cancer de la vessie	miR-136 ↗
	miR-152 ↘
Carcinome des cellules rénales	miR-15 ↗

Tableau 4 : Dérèglement de l'expression de miARNs urinaires dans les maladies rénales

(D'après Sun and Lerman, 2019)

5.4. Les miARNs et leur potentiel thérapeutique

Le rôle des miARNs dans la physiopathologie de plusieurs maladies rénales pourrait ouvrir de nouvelles voies pour une thérapie basée sur les miARNs. Il y a deux approches dans le développement de ces thérapeutiques : l'une est basée sur les oligonucléotides qui bloquent la fonction des miARNs (Inhibiteur de miARNs ou AntagomiR ou Anti-miR) ou qui miment l'expression des miARNs endogènes et augmentent l'activité des miARNs (Mimic de miARNs) (Lu and Rothenberg, 2018). Plus récemment,

des exosomes et des vecteurs viraux codant des ShARN ont également été introduits dans l'arsenal thérapeutique. Actuellement, l'utilisation des miARNs a rapidement progressé au point d'être testée comme cibles thérapeutiques, principalement en oncologie (Hashemi and Gorji-Bahri, 2020; Hayes et al., 2014). Le médicament à base de miARN le plus étudié en dehors du domaine du cancer est le miravirsen. Cet anti-sens du miR-122 inhibe la réplication du virus de l'hépatite C. En particulier, ce médicament est déjà en essai clinique de phase II avec succès (Bonneau et al., 2019; Lanford et al., 2010; Rupaimoole and Slack, 2017; van der Ree et al., 2014).

Les tentatives de thérapie reposant sur l'utilisation de miARNs dans les maladies rénales visaient principalement à prévenir le développement de la fibrose rénale (François and Chatziantoniou, 2018). De nombreuses études expérimentales sur des modèles animaux ont porté sur le rôle thérapeutique potentiel des miARNs dans l'IRC et des résultats prometteurs sur l'arrêt du développement de la fibrose rénale semblent avoir été obtenus soit en diminuant l'expression du miR- 21 (Chau et al., 2012; Zhong et al., 2013, 2011), du miR- 29c (Long et al., 2011), du miR- 214 (Denby et al., 2014), du miR- 433 (Li et al., 2013), et du miR- 192 (Deshpande et al., 2013; Putta et al., 2012), soit en surexprimant le miR- 29b (Chen et al., 2014; Qin et al., 2011). Le ralentissement et la stabilisation des lésions fibrotiques rénales ont été obtenus par injection intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée des molécules Mimics ou d'Inhibiteurs miARNs ou, plus fréquemment, par injection intraveineuse de plasmides exprimant des miARNs ou des ARN à courte épingle à cheveux. L'utilisation du molécule anti-sens du miR-21 dans le traitement d'IRC est un exemple. L'injection sous-cutanée hebdomadaire de l'antagomir spécifique contre le miR-21 dans un modèle de souris atteint d'IRC a permis non seulement de réduire la fibrose rénale, mais aussi de prolonger la durée de vie des souris atteintes d'IRC (Zhong et al., 2013). Ce résultat a été associé à l'efficacité de l'antagomir pour inverser les dommages causés aux cellules glomérulaires et tubulaires. Une expérience similaire a été réalisée dans un modèle de néphropathie diabétique (ND). Une des principales caractéristiques de la ND est également le développement de la fibrose rénale. Plusieurs études ont mis en évidence que le dérèglement de l'expression des membres de la famille du miR-29 (a, b et c) joue un rôle important dans la pathogénie de la fibrose rénale (Trionfini et al., 2015). Chen et ses collègues (Chen et al., 2014) ont étudié l'efficacité de la surexpression du miR-29b chez des souris diabétiques db/db. Ils ont utilisé la technique de transfert de gènes par ultrasons et microbulles pour restaurer le niveau de miR-29 dans les reins. Avec cette approche, ils ont démontré que miR-29b est capable de bloquer la voie du TGF- β /Smad3, diminuant l'accumulation de la matrice de collagène et réduisant l'inflammation dépendant de la Sp1/NF- κ B (Chen et al., 2014). Cependant, de nombreux obstacles doivent être encore surmontés avant que les thérapies de l'IRC à base de miARNs puissent être appliquées en pratique clinique, notamment en ce qui concerne les méthodes d'administration et les problèmes de sécurité. En effet, le miARN cible doit

être spécifique au rein afin d'éviter tout effet indésirable potentiel sur d'autres tissus et organes, et ne doit affecter qu'une seule cible (ou des cibles agissant dans la même voie) afin d'éviter les effets indésirables, comme cela a été décrit pour le miR- 21, dont l'inhibition induit la mort cellulaire en plus de bloquer la fibrose rénale (Zhong et al., 2011). Jusqu'à présent, ces limitations ont été partiellement surmontées soit par l'administration locale des médicaments à base de miARNs, soit par l'utilisation de vecteurs contenant des promoteurs inductibles et spécifiques au rein. Un essai clinique de phase II est en cours chez des patients atteints du syndrome d'Alport pour tester un agent anti-miR-21 sur le rein (identifiant ClinicalTrials.gov NCT02855268) sur la base de son effet protecteur contre la fibrogenèse et l'inflammation induites par le TGF- β observées chez des souris KO pour le collagène de type IV à 3 chaînes (Gomez et al., 2015; Guo et al., 2019). Bien qu'il y ait encore des limitations, les résultats disponibles dans ce domaine sont prometteurs (Pedrosa et al., 2021).

OBJECTIFS DE LA THESE

Notre laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années à la voie de signalisation minéralocorticoïde. Comme nous l'avons vu dans le chapitre « Introduction », cette voie de signalisation joue un rôle essentiel dans la physiologie rénale, en régulant notamment la réabsorption de sodium (Viengchareun et al., 2007). De nombreuses données ont montré qu'une altération de la voie de signalisation minéralocorticoïde, affectant soit l'expression soit la fonction du MR, est associée à des pathologies telles que l'hypertension artérielle (Shibata and Itoh, 2012), la néphropathie diabétique (Bertocchio et al., 2011), la fibrose rénale ou encore l'insuffisance rénale chronique (Shrestha et al., 2019). La compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant l'expression rénale ou la fonction du MR est donc essentielle pour mieux appréhender ces pathologies, proposer de nouvelles voies thérapeutiques et surveiller l'évolution de ces pathologies. Cependant, les mécanismes moléculaires régulant l'expression rénale du MR restent encore méconnus.

Le MR est fortement exprimé dans les segments distaux corticaux (Doucet and Katz, 1981; Lombes et al., 1990), là où la lumière tubulaire est plutôt hypotonique (50 mOsmol/kg). A l'inverse, l'expression du MR est beaucoup plus faible dans la médullaire rénale, là où la lumière tubulaire est hypertonique (1200 mOsmol/kg). Cette expression différentielle du MR nous a amenés à nous demander si les variations de tonicité extracellulaire, qui prévalent dans le néphron, du fait de l'existence du gradient corticopapillaire, peuvent moduler l'expression du MR. Pour apporter des éléments de réponse, notre laboratoire a développé un modèle de cellules principales rénales hautement différenciées, exprimant de façon endogène le MR et ses gènes cibles, et pouvant résister aux variations extrêmes de tonicité (Viengchareun et al., 2009). Nous avons alors démontré que ces variations de tonicité extracellulaire modulent l'expression rénale du MR par un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle qui fait appel à des protéines de liaison à l'ARN (RBPs), telles que la protéine Tis11b, qui déstabilise le transcrit MR en réponse à l'hypertonie (Viengchareun et al., 2014) ou la protéine HuR, qui stabilise le transcrit MR en réponse à l'hypotonie (Lema et al., 2017a). Dans ce contexte, nous avons formulé l'hypothèse que les miARNs, dont le rôle de répresseurs post-transcriptionnels a été largement documenté dans le développement et dans la physiopathologie rénale (Schena et al., 2014; Trionfini et al., 2015), pourraient également contrôler l'expression rénale du MR en réponse à l'hypertonie.

Mon projet de Thèse a consisté, dans un premier temps, à tester l'hypothèse de l'implication des miARNs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR :

- **Quels sont les miARNs qui pourraient réguler l'expression du MR en réponse à l'hypertonie ?**
- **Comment les miARNs candidats pourraient interagir fonctionnellement avec le transcrit MR ?**
- **Quel est l'impact de cette modulation de l'expression du MR sur la signalisation minéralocorticoïde ?**

L'identification de ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression du MR, dans des cellules rénales adultes, nous a alors amenés à nous demander si ce mécanisme de régulation pourrait notamment réguler l'expression rénale du MR durant la période périnatale. En effet, les travaux de notre laboratoire avaient permis de montrer que les nouveau-nés à terme présentent, dans les premiers jours de vie, une perte d'eau et de sel, associée à une perte physiologique de poids, qui pouvait s'expliquer par un faible niveau d'expression du MR à la naissance avec des taux d'aldostérone très élevés, révélant une résistance partielle à l'aldostérone (Martinerie et al., 2009b). Cette perte d'eau et de sel est notamment majorée chez les nouveau-nés prématurés.

Dans la seconde partie de mon travail de Thèse, j'ai donc cherché à évaluer la pertinence de ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle durant la période périnatale :

- **Les miARNs candidats, précédemment identifiés, seraient-ils exprimés durant la période périnatale ?**
- **Pourrait-on moduler l'expression de ces miARNs afin d'analyser l'impact de cette modulation sur l'expression du MR et la voie de signalisation minéralocorticoïde ?**
- **Ces miARNs candidats pourraient-ils représenter des biomarqueurs (prognostiques ou prédictifs) de la perte de sel ou des cibles thérapeutiques ?**

RESULTATS - DISCUSSIONS

Partie 1 : Contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du récepteur minéralocorticoïde par les miARNs en réponse à un stress hypertonique

1. Justification du projet

1.1. Contexte de l'étude

L'expression du MR représente l'élément clé de la réponse à l'aldostérone dans le contrôle de la balance hydrosodée ainsi que dans certaines pathologies rénales.

Les travaux anciens d'A. Doucet et de M. Lombès avaient montré que l'expression du MR est détectable dans le cortex rénal, là où la lumière du tubule est plutôt hypotonique alors que son expression est très faible au niveau de la médullaire (Doucet and Katz, 1981; Lombes et al., 1990), là où la lumière du tubule est plutôt hypertonique (Knepper, 1982). C'est dans ce contexte, que notre équipe a ensuite démontré que les variations de tonicité extracellulaire, qui prévalent dans les différents segments néphroniques, et qui sont générées par le gradient cortico-papillaire et maintenues par le système *recta vasa*, peuvent moduler l'expression du MR. Ainsi, l'hypertonie diminue l'expression rénale du MR, alors que l'hypotonie augmente son expression (Viengchareun et al., 2009).

Les mécanismes moléculaires sous-jacents mettent en jeu des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle impliquant, en particulier, le recrutement de protéines de liaison à l'ARN (*RNA-binding proteins* ou *RBP*). En effet, notre équipe a démontré que l'hypertonie altère la signalisation minéralocorticoïde en recrutant la protéine de liaison à l'ARN, Tis11b (*Tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11b*), qui accélère la dégradation du transcrit MR (Viengchareun et al., 2014). A l'inverse, l'hypotonie recrute la protéine de liaison à l'ARN, HuR (*Human antigen R*), qui en se liant à la région 3'-UTR du transcrit MR, favorise l'épissage de la forme complète du transcrit MR (Lema et al., 2017b) et stabilise le transcrit MR en se liant à sa région 3'-UTR (Lema et al., 2017a), renforçant ainsi la signalisation minéralocorticoïde. C'est dans ce contexte, que nous avons souhaité tester l'hypothèse du recrutement des miARNs, qui représentent une autre classe de régulateurs post-transcriptionnels.

1.2. Hypothèse de travail

Nous avons alors formulé l'hypothèse que les miARNs pourraient réguler l'expression rénale du MR en réponse aux variations de tonicité extracellulaire et cela pour deux raisons. Premièrement, ces petits ARN non codants endogènes, peuvent réguler négativement l'expression des gènes, principalement en ciblant la région 3'-UTR des transcrits cibles. Deuxièmement, nous avons identifié des sites de fixation potentiels pour des miARNs dans la région 3'-UTR du transcrit MR. Les données de la littérature indiquaient, par ailleurs, que l'action de certains miARNs pouvait avoir un impact sur le transport ionique en réponse à l'aldostérone (Edinger et al., 2014; Elvira-Matelot et al., 2010; Lin et al., 2014, 2011; Liu et al., 2017). Enfin, d'autres travaux avaient rapporté que les miARNs pouvaient moduler l'expression du MR dans des situations physiopathologiques (Mannironi et al., 2013; Nossent et al., 2011; Ozbaki-Yagan et al., 2020; Söber et al., 2010; Yang et al., 2019). Toutefois, peu d'étude n'a décrit, à ce jour, un rôle des miARNs dans le contrôle de l'expression rénale du MR en réponse aux variations de tonicité extracellulaire.

1.3. Objectifs du travail

Avant mon arrivée au laboratoire, notre équipe avait utilisé une approche de screening à haut débit faisant appel à des plaques TLDA (*TaqMan Low Densite Array*) pour rechercher des miARNs dont l'expression est modulée par l'hypertonie dans les cellules KC3AC1, un modèle de cellules rénales hautement différenciées qui avaient été développées au laboratoire, et qui expriment de façon endogène le MR. Ces cellules ont été incubées pendant 6 h en présence de milieu isotonique ou hypertonique suite à l'ajout de 0,2 M de raffinose dans le milieu de culture. Cette approche de screening avait permis d'identifier des miARNs dont l'expression est modulée par l'hypertonie, bien que le nombre de répliquats fût faible. Plus récemment, nous avons fait réaliser, par la Plateforme de Séquençage de l'Institut du Cerveau et de la Moelle (Dr Yannick Marie), un miR-Seq (ou *miR-Sequencing*) avec un nombre d'échantillons plus important ($n = 4$) afin de compléter la liste des miARNs dont l'expression est modulée par l'hypertonie dans les cellules KC3AC1. Ainsi, une « short liste » de miARNs a pu être établie selon les critères suivants : fold change > 1,5, P value < 0,05 et présence de sites putatifs de liaison pour les miARNs candidats dans la région 3'-UTR du transcrit MR.

Dans cette 1^{ère} partie des résultats, mes objectifs étaient de :

- Valider les miARNs candidats dont l'expression est induite par l'hypertonie
- Etudier l'interaction fonctionnelle des miARNs candidats avec le transcrit MR
- Analyser les conséquences fonctionnelles de la surexpression ou de la contre-expression des miARNs candidats sur l'expression du MR et la voie de signalisation minéralocorticoïde

2. Résultats

Les principaux résultats sont présentés sous la forme d'un article intitulé « ***miR-324-5p and miR-30c-2-3p Alter Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling Under Hypertonicity*** ». Cet article expérimental est en révision au journal « *Cellular and Molecular Life Sciences* ».

Article 1

miR-324-5p and miR-30c-2-3p Alter Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling Under Hypertonicity

Thi An Vu, Ingrid Lema, Lydie Cheval, Imene Hani, Laura Atger-Lallier, Vilayvane Souvannarath, Mélanie Souvanheuane, Yannick Marie, Sylvie Fabrega, Anne Blanchard, Jérôme Bouligand, Peter Kamenický, Gilles Crambert, Laetitia Martinerie, Marc Lombès, Say Viengchareun.

Article en révision dans *Cellular and Molecular Life Sciences*

miR-324-5p and miR-30c-2-3p Alter Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling Under Hypertonicity

Thi An Vu¹, Ingrid Lema¹, Lydie Cheval², Imene Hani¹, Laura Atger-Lallier¹, Vilayvane Souvannarath¹, Mélanie Souvanheuane¹, Yannick Marie³, Sylvie Fabrega⁴, Anne Blanchard⁵, Jérôme Bouligand^{1,6}, Peter Kamenický^{1,7}, Gilles Crambert², Laetitia Martinerie^{1,8}, Marc Lombès¹, Say Viengchareun¹.

¹ Université Paris-Saclay, Inserm, Physiologie et Physiopathologie Endocriniennes, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France;

² Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm, Sorbonne Université, Université de Paris, F-75006 Paris, France;

³ Plateforme de Genotypage Séquençage (iGenSeq), Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Hôpital Sapêtrière, 75013, Paris, France;

⁴ Plateforme Vecteurs Viraux et Transfert de Gènes, Structure Federative de Recherche Necker, UMS 24, UMS 3633, Faculté de Santé, Université de Paris, France;

⁵ Inserm, Centre d'Investigations Cliniques 9201, 75015, Paris, France;

⁶ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital de Bicêtre, 94275, Le Kremlin Bicêtre, France;

⁷ Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, 94275, Le Kremlin Bicêtre, France;

⁸ Service d'Endocrinologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Assistance-Publique Hôpitaux de Paris, 75019, Paris, France & Université de Paris, France;

Correspondence should be addressed to:

Say Viengchareun, PhD

Inserm U1185, Faculté de Médecine Paris-Saclay
63 rue Gabriel Peri, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

E-mail: say.viengchareun@universite-paris-saclay.fr

Tel: 33 1 49 59 67 15

Fax: 33 1 49 59 67 32

Keywords microRNA, Mineralocorticoid receptor, Aldosterone, Hypertonicity, Posttranscriptional regulation, Sodium reabsorption.

Abbreviations MR: Mineralocorticoid Receptor; HuR: Human antigen R; Sgk1: Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1; Tis11b: Tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11b; RBP: RNA-Binding Protein; 3'-UTR: 3'-untranslated region; ELAVL1: Embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila homolog-like 1; EGF: Epidermal growth factor; T3: Triiodothyronine; DCC: Dextran-coated charcoal; Iso: Isotonicity; Hyper: Hypertonicity; miRNAs: microRNAs; Dox: Doxycycline.

Abstract

Background Importance of the Mineralocorticoid Receptor (MR) for sodium-retaining action of aldosterone in the distal nephron is well established but mechanisms regulating MR expression are still poorly understood. We previously showed that RNA Binding Proteins (RBPs) regulate MR expression at the post-transcriptional level in response to variations of extracellular tonicity. Herein, we highlight a novel regulatory mechanism, involving recruitment of microRNAs (miRNAs) under hypertonicity.

Methods High throughput screening approaches (TLDA and miRNAs-Seq) were used to identify miRNA candidates. RT-qPCR validated candidates and transfection of a luciferase reporter construct together with miRNAs Mimics and Inhibitors demonstrated their functional interaction with target transcripts. Overexpression strategies, using Mimics or lentivirus, revealed impact on MR expression and signaling in renal KC3AC1 cells.

Results We identified miR-324-5p and miR-30c-2-3p, expression of which is increased under hypertonicity in renal KC3AC1 cells. We demonstrated that these miRNAs directly affect *Nr3c2* (MR) transcript stability, act with Tis11b to destabilize MR transcript but also repress *Elavl1* (HuR) transcript, a master RBP, which was shown to enhance MR expression and signaling. In addition, overexpression of miR-324-5p and miR-30c-2-3p alter MR expression and signaling in KC3AC1 cells with blunted responses in terms of aldosterone-regulated genes expression. Finally, we confirm that their expression is increased by hypertonicity *in vivo*, in kidneys of mice treated with furosemide.

Conclusions Collectively, we provide evidence that miRNAs and RBPs cooperate in a network to modulate MR expression and signaling. These findings may have major implications for the pathogenesis of renal dysfunctions, sodium retention and mineralocorticoid resistance.

Introduction

The Mineralocorticoid Receptor (MR), encoded by the *NR3C2* gene, belongs to the nuclear receptor superfamily, and mediates aldosterone action by stimulating transcription of target genes, involved in the control of sodium reabsorption in tight epithelia [1], such as the α subunit of the Epithelial Na⁺ Channel [2–4], the Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (Sgk1) [5, 6], or the Glucocorticoid-induced leucine zipper transcription factor (Gilz) [7]. Thus, MR controls salt and water balance and participates to regulation of blood pressure. This MR signaling is not functional in newborns due to low renal MR expression at birth, which accounts for the physiologic partial aldosterone resistance of human newborns, reminiscent of the MR haploinsufficiency reported in autosomal dominant pseudohypoaldosteronism [8]. Moreover, many studies showed that MR plays pivotal roles in the pathogenesis of several diseases including heart failure, hypertension [9] or nephropathies [10]. However, mechanisms controlling renal MR expression remain poorly understood. MR is mainly expressed in distal nephron, with marked expression in the cortex where the tubular lumen is rather hypotonic while its expression is low in the medulla [11, 12], which is hypertonic. Previously, we have demonstrated that variations of extracellular tonicity, prevailing in nephronic segments, modulate MR expression through post-transcriptional mechanisms involving recruitment of RNA Binding Proteins (RBPs) [13]. Indeed, we showed that hypertonicity compromises MR signaling by recruiting Tis11b (Tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11b), which degrades MR mRNA [14] while HuR (Human antigen R) favors MR mRNA stability [15] and edits MR mRNA [16], thus enhancing MR signaling under hypotonicity. In this context, we could not exclude another working hypothesis involving recruitment of microRNAs (miRNAs), another class of post-transcriptional regulators. These endogenous short non-coding RNAs [17, 18], which negatively regulate gene expression mainly by targeting 3'-Untranslated Region (3'-UTR) of target transcripts, are involved in various biological processes [19–21]. The miRNAs-target gene interaction constitutes a complex network. Indeed, overexpression of a particular miRNA affects expression of hundreds of target transcripts [22, 23]. Conversely, one specific transcript is generally regulated by several miRNAs [24]. Furthermore, it was shown that miRNAs can be secreted in plasma or urine and might thus constitute promising biomarkers, as well as, potential novel therapeutic targets for renal dysfunction [25, 26]. Indeed, accumulating evidence now suggests that miRNAs exert key roles in development but also in renal diseases [27–29] especially those affecting MR signaling [30]. For instance, putative binding sites for miRNAs were identified in 3'-UTR of transcripts related to renin-angiotensin-aldosterone system [31]. miR-34c-5p was shown to play important role in aldosterone-induced fibrosis in kidney [32]. miRNAs were also shown to impact ionic transport in response to aldosterone [33–37] or MR expression in other pathophysiological situations [31, 38–41]. However, no study reported a role of miRNAs on MR expression in response to tonicity. We have identified miR-324-5p and miR-30c-2-3p, expression of which is upregulated by hypertonicity in murine principal KC3AC1 cells. Herein, we describe how they functionally interact with MR transcript, in synergy with RBPs, and subsequently affect its expression and MR signaling. *In vivo*, we have further demonstrated that their expression is significantly increased in kidneys of mice treated with furosemide, a diuretic known to increase the relative luminal tonicity in the distal nephron.

Materials and methods

Cell culture

KC3AC1 cells were obtained by a targeted oncogenesis strategy in a transgenic mouse model in which expression of the T Antigen of SV40 was placed under the control of the proximal promoter of the human *NR3C2* gene. These principal cells, which endogenously express MR, were isolated from the cortical collecting ducts [13]. Cells were cultured under isotonic medium (300 mOsm/kg) with DMEM/HAM'S F12 supplemented with 5% dextran charcoal-coated calf serum (DCC), 2 mM glutamine, 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Life Technologies), 5 µg/ml Insulin (Sigma), 5 µg/ml transferrin (Sigma), 50 nM sodium selenite (Sigma), 50 nM dexamethasone (Sigma), 2 nM triiodothyronine T3 (Sigma), 10 ng/ml epithelial growth factor (EGF) (PeproTech). Hypertonic conditions (500 mOsm/kg) were achieved by adding 0.2 M raffinose (Sigma). Minimal medium lacking dexamethasone, EGF and DCC was used to study aldosterone action (Acros Organics). HEK293T cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest), 2 mM glutamine, 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/mL streptomycin.

Total RNAs isolation

RNAs from cultured cells or from mouse kidneys were extracted with NucleoSpin® miRNA kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's protocol. This kit facilitates isolation of both miRNAs and large RNAs from each sample for use in RT-qPCR, Taqman Low Density Array analysis and miRNAs-sequencing.

Taqman Low Density Array (TLDA)

TLDA allows testing of a large subset of miRNAs by RT-qPCR in a single assay. First, 600 ng of miRNAs from isotonic or hypertonic medium-incubated KC3AC1 cells were subjected to reverse transcription (RT) using the TaqMan® miRNA reverse transcription kit and Megaplex™ RT primers Pool Set v2.0 (Pool A and B) according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). Amplification step was then performed in the Service of Molecular Genetics, Pharmacogenetics, and Hormonology of Bicetre Hospital (France). RT products were diluted with RNase-free water, combined with TaqMan® 2X Universal PCR Master mix, No AmpErase UNG then loaded into four TaqMan® rodent microRNA array v2.0 (Applied Biosystems: one Array A and one Array B for isotonic or hypertonic condition), which are 384-well microfluidic cards embedded TaqMan probes in each well for different mature rodent miRNAs enabling accurate quantification of 585 miRNAs for mouse for each condition. snoRNA 202 transcript was used for normalization. Quantitative PCR was performed according to the manufacturer's instructions and run on an 7900 HT Fast Real time PCR system with 384-Well Block Module (Applied Biosystems). Results were analyzed on SDS 2.3 software (Applied Biosystems) and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ values with $\Delta Ct = Ct_{miR} - Ct_{snoRNA\ 202}$.

miRNAs-Sequencing (miRNAs-Seq)

miRNAs-Seq was performed to profile different miRNAs under isotonic or hypertonic medium-incubated KC3AC1 cells. An amount of 200 ng total RNAs (containing miRNAs) per sample (n=4 per condition) was used to conduct miRNAs library preparation and sequencing at ICM platform (Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Paris, France). Concentration and size distribution of all samples were determined by 4200 TapeStation (Agilent). Library preparation for sequencing was performed on the RNA fragment under 200 bases by using the QIAseq® miRNA Library kit according to the manufacture's protocol (Qiagen). Briefly, a pre-adenylated DNA

adapter was ligated to the 3'-end of all mature miRNAs, an RNA adapter was ligated to the 5'-end of mature miRNAs. Ligated miRNAs were reverse transcribed to cDNA using a reverse transcription (RT) primer with integrated Unique Molecular Indices (UMIs) that are molecular tags used to detect and quantify unique mRNA transcripts. After reverse transcription, a cleanup of the cDNA was performed using a streamlined magnetic bead-based method before and after library amplification. Next-generation Sequencing was performed in single end mode, 1x75 bp, on the NextSeq 500 Illumina System platform with approximately 32 million reads per sample, following the manufacturer's protocol. Reads quality was assessed using FastQC on the FASTQ file. Alignment was performed against the mouse genome (GRCh38/mm10). Raw miRNA counts and differential expression were analyzed using R/Bioconductor package DESeq2. An adjusted P -value < 0.05 with Benjamini & Hochberg False Discovery Rate method was considered as statistically significant.

miRNAs RT-qPCR

For miRNAs RT-qPCR, a multiplex reverse transcription protocol was performed to reverse transcribe simultaneous multiple miRNAs (12 miRNAs maximum) into cDNA from 200 ng of miRNAs using the TaqMan® microRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) and diluted (1:100 in 1X TE) specific stem-loop primers for corresponding miRNAs (Applied Biosystems). RT products were used for quantification of individual miRNAs that was run on a QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems) using specific miRNAs TaqMan probes (Life Technologies) and TaqMan Universal PCR Master mix, No AmpErase UNG, 2X (Life Technologies). List of specific miRNA stem-loop primers and TaqMan probes are presented in Supplementary Table 1. The specificity of each miRNA TaqMan probe was confirmed by cloning each amplicon into the pGEMT-easy plasmid (Promega) and sequencing. Efficiency of qPCR was controlled before analysis. Relative expression in each miRNA was normalized to the housekeeping miRNA (mmu-miR-16 or snoRNA 202), where control condition values were arbitrarily set at 100%.

mRNAs RT-qPCR

For mRNAs RT-qPCR, after DNase I treatment (Biolabs), 1 µg of total RNAs was reverse transcribed using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies). Samples were analyzed by RT-qPCR using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) with the primers indicated in Supplementary Table 2a and run on QS6 Real-Time PCR System (Life Technologies). The specificity of each primer set was confirmed by cloning each amplicon into the pGEMT-easy plasmid (Promega) and sequencing. Efficiency of qPCR was controlled before analysis. Relative expression in each sample was calculated as a ratio (amol of specific gene/fmol of *18S* or amol of *36b4*), where the control condition values are arbitrarily set at 100%.

Plasmid constructs

Wild type murine *Elavl1* (HuR) 3'-UTR (mHuR 3'-UTR) was amplified by PCR from cDNA using specific primers presented in Supplementary Table 2b, in which *SpeI* and *HindIII* restriction sites were introduced to facilitate cloning into the pMIR-Report™ plasmid (Life Technologies). pMIR-mMR-3'-UTR plasmid and Tis11b-encoding pTarget vector were generated as previously described [14]. All plasmids were sequenced to verify nucleotide identity at Eurofins Genomics platform (Cologne, Germany).

Luciferase assays

To study functional interaction between miRNAs and MR or HuR 3'-UTR, HEK293T cells were transfected, using Lipofectamine 2000, with the luciferase constructs (40 ng/well of 96-well plates) with either increasing concentrations of Mimics or negative control Mimics (CTR Mimics) or with maximal effective concentration of Inhibitors or negative control Inhibitors (CTR Inhibitors) (Life Technologies, see sequences in Supplementary Table 3. To evaluate the cooperativity between miRNAs and the Tis11b RNA-Binding Protein on *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) 3'-UTR, the Tis11b-encoding pTarget vector (10 ng/well of 96-well plates) was cotransfected into HEK293T together with pMIR-mMR-3'-UTR (40 ng) or pMIR-mHuR-3'-UTR (40 ng) with or without Mimics or control Mimics. Cell lysates were collected 24 h post-transfection to measure luciferase activities. Luciferase activities were normalized to β -galactosidase activities as previously described[14].

Modulation of miR-30c-2-3p expression

KC3AC1 cells, seeded in 12 well-plates (300,000 cells/well), were transiently transfected on day 2 of cell culture, using Lipofectamine RNAiMax reagent (Life Technologies), with 10 nM 30c-2-3p Mimics or negative control Mimics (CTR Mimic) in order to overexpress miR-30c-2-3p or with 10 nM 30c-2-3p Inhibitors or control negative Inhibitors (CTR Inhibitor) in order to repress miR-30c-2-3p expression. To study functional consequences of miR-30c-2-3p overexpression on MR signaling, renal cells were deprived for 24 h in minimal medium then treated for 1 h with 10 nM aldosterone. Total RNAs and protein extracts were processed for RT-qPCR and Western Blot analysis, after 18 h and 48 h, respectively.

Establishment of KC3AC1 clones stably transduced with lentivirus expressing inducible miR-324-5p

Production of HIV-1 Δ U3-SIN lentivirus particles was carried out at the Viral Vector and Gene Transfert Platform, (Structure Federative de Recherche Necker, UMS 24, UMS 3633, Faculté de Santé, Université de Paris, France) by cotransfection into HEK293T cells of the miR-324-5p inducible lentiviral plasmid (ShMIMIC Inducible miR-324-5p, #GSH11929-224640456, Dharmacon) or the control inducible lentiviral plasmid (SMARTvector Inducible Non-targeting mCMV-TurboRFP, #VSC1165, Dharmacon) with the vesicular stomatitis G protein (VSV-G) envelope, and other packaging plasmids using the standard calcium phosphate transfection method. After production, functional lentiviral titers were determined in hHTC116 cells by puromycin selection or Red Fluorescent protein Fluorescence Activated Cell Sorting analysis, 48 h after induction by doxycycline (Sigma) at 1 μ g/ml. The harvested supernatant containing ShMIMIC miR-324-5p or scrambled lentiviral particles was transduced into renal KC3AC1 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 20. Selection of transduced cells was performed by adding 1.5 μ g/ml of puromycin (InvivoGene) 48 h after transduction. After 5 days of selection, cells were subjected to serial dilutions in 96-well plates and maintained in culture up to 15 days until expansion of isolated clones. After 48 h incubation with doxycycline (1 μ g/ml), KC3AC1 clones overexpressing miR-325-5p could be visualized thanks to observation of the Red Fluorescent Protein (excitation at 553 nm/emission at 574 nm) on BX73 optical microscope (Olympus). Finally, miRNAs RT-qPCR analyses allowed selection of the clone Sm-A1, which stably overexpresses scrambled control miRNAs and the clone Sh-H8, which, on the opposite, stably overexpresses the miR-324-5p. Sm-A1 and Sh-H8 clones were cultured in the same medium than the parental KC3AC1 cells with puromycin (1 μ g/ml). To analyze the impact of miR-324-5p overexpression on MR signaling, Sh-A1 and Sh-H8 clones, cultured on filters onto 12 well-plates (1.2 10^6 cells/filtre) were deprived in minimal medium lacking dexamethasone, EGF, DCC concurrently subjected to Doxycycline (1 μ g/ml) induction

for 48 h then stimulated with 10 nM aldosterone for 1 h. Total RNAs were thereafter extracted then relative MR target gene expression was analyzed by RT-qPCR.

Western blot analyses

Forty micrograms of extracted proteins were subjected to SDS-PAGE and processed for detection of MR protein together with α -tubulin protein for loading normalization. The signal fluorescence intensity was determined with an Odyssey® (Li-Cor). Antibody sources and dilutions are given in Supplementary Table 4.

Investigations in mice

Mice received an intraperitoneal injection of furosemide (40 mg/kg, Renaudin, Aïnhua, France) for 4 h. Animals (n=5-6 per group) were euthanized and kidneys collected and snap-frozen in liquid nitrogen for subsequent analyses. Mice were bred according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The animal facility was granted approval (no. C94-043-12) by the Ministère de l'Agriculture, France. All procedures were approved by the local ethic committee CAPSud (N°2012-021).

Statistical analyses

Data are means±SEMs. t-test with Welch's correction or One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test were used when appropriate to determine significant differences (GraphPad 6.0 Prism software). A *P*-value below 0.05 was considered as statistically significant (* or § *P*<0.05; ** or §§ *P*<0.01; *** or §§§ *P*<0.001 ; **** or §§§§ *P*<0.0001).

Results

Hypertonicity induces miRNAs expression

KC3AC1 cells were incubated for 6 h under isotonic or hypertonic medium. Then, TLDA and miRNAs-Seq allowed us to establish a short list of 5 miRNA candidates, expression of which was induced under hypertonicity with a fold-induction ≥ 1.5 : miR-135a-5p, miR-28a-3p, miR-30c-2-3p, miR-324-5p, miR-335-5p. We could locate binding sites for these miRNAs in murine *Nr3c2* (MR) 3'-UTR using Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_72/)[42] and miRmap (<https://mirmap.ezlab.org/app/>)[43] softwares. miR-335-5p and miR-324-5p present with one binding site in the *Nr3c2* (MR) 3'-UTR while miR-135a-5p, miR-28a-3p and miR-30c-2-3p have two distinct binding sites (Fig. 1a). Of note, binding sites for miR-28a-3p are very close, while that of miR-30c-2-3p and miR-135a-5p are near the stop codon and the polyA tail. Identification of such binding sites suggested that *Nr3c2* transcript might be targeted by these miRNAs. We confirmed the regulation of these miRNA candidates by analyzing their expression profile in KC3AC1 cells using RT-qPCR. Following TLDA screening, RT-qPCR analyses demonstrated that hypertonicity represses MR expression (Fig. 1b), confirming our previous observations [13, 14]. miR-324-5p expression was significantly increased under hypertonicity, however, expression of miR-135a-5p and miR-335-5p were not changed. Likewise, following miRNAs-Seq screening, RT-qPCR analyses also confirmed that hypertonicity decreased MR expression while increasing miR-28a-3p and miR-30c-2-3p expression (Fig. 1c). Because induction of miR-28a-3p expression was very weak (~10%) under hypertonicity, we further focused on miR-30c-2-3p and miR-324-5p.

miR-324-5p directly targets *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) transcripts

To demonstrate functional interaction between miRNAs and *Nr3c2* (MR) transcript, we used the pMIR-Luc reporter plasmid fused to murine *Nr3c2* (MR) 3'-UTR [14]. HEK293T cells were transfected with increasing concentrations (10 to 100 nM) of CTR or 324-5p Mimics. While CTR Mimics did not affect luciferase activity, 324-5p Mimics decreased luciferase activity in a dose-dependent manner with a 40% maximum decrease reached with 100 nM Mimics (Fig. 2a). This decrease of luciferase activity was blunted when cells were transfected with 100 nM 324-5p Inhibitors (Fig. 2b), confirming that miR-324-5p directly targets *Nr3c2* (MR) transcript. We also identified a binding site for miR-324-5p in *Elavl1* (HuR) 3'-UTR, located at +186. Therefore, we cloned the murine *Elavl1* (HuR) 3'-UTR downstream of luciferase cDNA in the pMIR-Luc plasmid. Transfection assays were next performed in HEK293T with increasing concentrations (10 to 100 nM) of CTR or 324-5p Mimics, revealing that 324-5p Mimics also decreased luciferase activity by almost 40% with 10 nM 324-5p Mimics and by more than 60% with 100 nM 324-5p Mimics (Fig. 2c). This decrease of luciferase activity was also blunted in presence of 100 nM 324-5p Inhibitors (Fig. 2d), confirming that miR-324-5p also directly targets *Elavl1* (HuR) transcript [15, 16].

miR-30c-2-3p directly targeted *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) transcripts

We used the same approach to show that miR-30c-2-3p directly targets *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) transcripts since we identified a binding site for miR-30c-2-3p in *Elavl1* (HuR) 3'-UTR. We transfected HEK293T cells with increasing concentrations (0.5 to 5 nM) of CTR or 30c-2-3p Mimics. While CTR Mimics did not affect luciferase activity, 30c-2-3p Mimics significantly decreased luciferase activity in a dose-dependent manner with a maximum of 50% decrease reached with 5 nM Mimics (Fig. 3a). This effect was blunted when cells were transfected with 10 nM 30c-2-3p Inhibitors (Fig. 3b), thus confirming that miR-30c-2-3p directly targets *Nr3c2* (MR) transcript. We

next performed similar transfection assays and demonstrated that miR-30c-2-3p also directly targets *Elavl1* (HuR) transcript (Fig. 3c, d). Altogether, Figures 2 and 3 indicate that both miRNAs act in a network to alter MR signaling by destabilizing *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) transcripts.

Cooperativity between miRNAs and Tis11b action

We previously demonstrated that Tis11b physically interacts with *Nr3c2* (MR) 3'-UTR by binding to AREs (Adenylate/uridylylate-Rich Elements) under hypertonicity [14]. Fig. 4a indicates location of the 9 AREs elements in murine *Nr3c2* (MR) 3'-UTR. The miR-324-5p binding site is positioned at the nucleotide +1132, between ARE6 and ARE7. miR-30c-2-3p presents with one binding site located near the stop codon, at nucleotide +219, and a second binding site located at nucleotide +1279. Therefore, we wondered whether Tis11b could act synergistically with miRNAs because such cooperativity had previously been reported [44]. HEK293T cells were transfected with the pMIR-Luc-*Nr3c2* (MR) 3'-UTR together with the Tis11b-encoding vector alone, with 324-5p or 30c-2-3p Mimics alone or in combination. Fig. 4b indicates that 324-5p Mimics decreased luciferase activity by 20% while 30c-2-3p Mimics decreased it by 30% (Fig. 4c) even in the presence of low concentrations of Mimics (10 nM and 0.5 nM, respectively). As expected, low amount of Tis11b (10 ng/well) also decreased luciferase activity by 20% (Fig. 4b, c). Furthermore, luciferase activity decreased by 40% to 50% when HEK293T cells were transfected simultaneously with Tis11b and either 324-5p (Fig 4b) or 30c-2-3p Mimics (Fig. 4c), thus providing evidence for a cooperative action between miRNAs and Tis11b in destabilizing *Nr3c2* (MR) transcript.

miR-30c-2-3p overexpression impacts MR expression and signaling

RT-qPCR, performed on KC3AC1 cells transfected with 30c-2-3p Mimics, confirmed that miR-30c-2-3p expression was increased (x2000) in transfected cells (Fig. 5a) resulting in a 25% decrease of *Nr3c2* (MR) mRNAs (Fig. 5b). As a result, MR protein (~130 kDa) levels were decreased by 50% in transfected cells compared to control (Fig. 5c). We also transfected 30c-2-3p Inhibitors in KC3AC1 cells to demonstrate that miR-30c-2-3p specifically targets *Nr3c2* (MR) transcript (Fig. 5d) and showed that complete inhibition of miR-30c-2-3p expression had no impact on MR expression (Fig. 5e). Thereafter, KC3AC1 cells were cultivated for 24 h in minimal medium then stimulated for 1 h with 10 nM aldosterone following transfection of 10 nM CTR or 30c-2-3p Mimics. As expected, aldosterone stimulated, by 1.4-fold, expression of *Tsc22d3* (Gilz), a classical MR target gene, when cells were transfected with CTR Mimics. However, this effect was reduced when cells were transfected with 30c-2-3p Mimics (Fig. 5f). Similar results were obtained for the kinase *Sgk1*. Aldosterone induced an increase of *Sgk1* expression (x1.3) but this stimulatory effect was weaker in the presence of 10 nM 30c-2-3p Mimics (Fig. 5g). Taken together, our findings highlight a critical role for miR-30c-2-3p in compromising MR signaling following reduction of MR expression in KC3AC1 cells.

Impairment of MR signaling in KC3AC1 cells stably expressing miR-324-5p

Because transient transfection with high concentrations of 324-5p Mimics had no impact on MR expression, we established stably-transduced renal KC3AC1 cells with lentivirus expressing inducible miR-324-5p to evaluate impact of its overexpression on MR expression and signaling. KC3AC1 cells were transduced with scrambled or miR-324-5p ShMIMIC lentiviral particles. After puromycin selection (1.5 µg/ml) and doxycycline induction (1 µg/ml), cells were subjected to serial dilutions to finally establish two cellular clones: Sm-A1 clone expressing scrambled miRNAs (Fig. 6, left panels) and Sh-H8 clone expressing miR-324-5p under doxycycline induction (Fig. 6, right panels). Given that expression of miRNAs was coupled to that of the red fluorescent protein, we used

fluorescence microscopy and RT-qPCR to select transduced clones that overexpressed either scrambled miRNAs or miR-324-5p (Supplementary Fig.1). Left panels in Fig. 6a indicate that incubation of Sm-A1 clone for 48 h with doxycycline had, as expected, no impact on miR-324-5p expression. As a consequence, *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) expression were not impaired (Fig. 6b, c). Conversely, miR-324-5p overexpression (x80) (Fig. 6d) induced a significant 20 % decrease of *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) transcripts in Sh-H8 clone (Fig. 6e, f). Finally, we determined impact of miR-324-5p overexpression on MR expression and signaling: Sm-A1 clone and Sh-H8 clone were cultivated for 48 h in minimal medium then stimulated for 1 h with 10 nM aldosterone. As expected, aldosterone induced a similar 20% increase of *Tsc22d3* (Gilz) expression when Sm-A1 clone was incubated in absence or presence of doxycycline (Fig. 6g). However, this aldosterone-induced expression of *Tsc22d3* (Gilz) was reduced when Sh-H8 clone was incubated in the presence of doxycycline (Fig. 6h). Altogether, these findings demonstrate that miR-324-5p also impairs MR signaling in KC3AC1 renal cells.

Expression of miR-324-5p and miR-30c-2-3p are increased in kidneys of mice treated with furosemide

To address the physiologic relevance of data obtained in KC3AC1 cells, we used kidney samples of mice treated for 4 h with furosemide, a *NKCC2* inhibitor. In cortex, basolateral fluid is maintained isotonic by vascularization, while luminal fluid, delivered at the end of distal loop, is hypotonic due to the removal of salt in this segment impermeable to water. Thus, furosemide, by acutely inhibiting salt reabsorption in thick limb, leads to an increase in the osmolality of fluid delivered to the distal nephron and to a decrease of MR expression, as previously published [14]. Thus, we demonstrated that miR-324-5p and miR-30c-2-3p expression were dramatically increased in kidneys of these furosemide-treated mice (Fig. 7a, b), thus demonstrating, *in vivo*, that increased luminal tonicity, enhanced miR-324-5p and miR-30c-2-3p expressions.

Discussion

We previously showed that MR expression is regulated by variations of extracellular tonicity prevailing in nephronic segments [13] and highlighted the predominant role of RBPs [14–16]. Herein, we demonstrate that miRNAs also modulate MR expression *in vitro* and *in vivo*. Using TLDA or miRNAs-Seq, we identified miR-324-5p and miR-30c-2-3p, expression of which is up-regulated under hypertonicity in renal cells and in kidneys of furosemide-treated mice, whereas MR expression is, in parallel, reduced. Renal cells resist from hypertonicity by recruiting TonEBP (TonE Binding Protein), which belongs to Rel factors family [45, 46]. This transcription factor binds Tonicity response Elements (TonE), located in promoter regions of target genes such as *Aldose Reductase* [47] or *Zfp361l* gene, which encodes Tis11b [13]. Jaspas software[48] identified TonE consensus sequence TGGAAANNYNY in regulatory regions of murine *mir324* and *mir30c-2* gene (Supplementary Fig. 2), suggesting that TonEBP may regulate expression of these miRNAs (Fig. 8). Moreover, we demonstrate that these miRNAs functionally interact with murine *Nr3c2* (MR) 3'-UTR, which is conserved among species and presents with the highest number of putative binding sites for miRNAs compared to other transcripts of the renin-angiotensin-aldosterone system [31]. Indeed, transfection of Mimics for both miRNAs decreased *Nr3c2* (MR) 3'-UTR-driven luciferase activity, an effect that was blunted by the corresponding Inhibitors. Given that cooperativity between RBPs and miRNAs had previously been reported [44], we transfected 324-5p or 30c-2-3p Mimics together with Tis11b in HEK293T cells and demonstrated that they cooperate to decrease *Nr3c2* (MR) 3'-UTR-driven luciferase activity. This latter result could be explained by the location of AREs in *Nr3c2* (MR) 3'-UTR, on which Tis11b binds, located close to binding sites for miR-324-5p and miR-30c-2-3p, thus facilitating MR-destabilizing action of Tis11b [49]. Indeed, Grimson *et al.* demonstrated the functional importance of the environment surrounding miRNAs binding sites for their destabilizing action [50]. We have also shown that both miRNAs act in a network to alter MR expression: miR-324-5p and miR-30c-2-3p directly affect *Nr3c2* (MR) transcript stability and in parallel destabilize *Elavl1* (HuR) transcript stability, a master RBP, which was shown to enhance MR expression and signaling under hypotonicity [15] (Fig. 8). Such a complex interplay between these two classes of regulators is now coming to light [44]. Next, we have analyzed impact of miR-30c-2-3p and miR-324-5p overexpressions on MR expression in KC3AC1 cells. miR-30c-2-3p is more effective than miR-324-5p in destabilizing *Nr3c2* (MR) 3'-UTR since its overexpression, following transfection of low concentrations of Mimics, led to a significant decrease of MR expression both at the messenger (25%) and protein (50%) levels, compromising MR signaling with blunted responses in terms of aldosterone-regulated gene expression (Fig. 8). In contrast, overexpression of miR-324-5p did not affect MR expression even with high concentrations of Mimics. Consequently, use of lentivirus expressing miR-324-5p has proven to be an efficient strategy to overexpress this miRNA in fully differentiated renal principal KC3AC1 cells, which fully express functional MR when high confluency is reached. Thus, we showed that Sh-H8 clone presented with a 20 % decrease in MR expression at the mRNA level responsible for a reduced aldosterone-induced expression of *Tsc22d3* (Gilz), thus demonstrating that this miRNA also impairs MR signaling (Fig. 8). This difference in efficacy could be explained by the number of binding sites for these miRNAs: there are two binding sites for miR-30c-2-3p at nucleotide +219 and +1279 whereas only one binding site for miR-324-5p is located at nucleotide +1131. Indeed, Doench *et al.*, 2004 reported that additivity between several identical binding sites for a miRNA might have a higher impact on its repressive action [51]. Another possible explanation relies on the location of the miR-30c-2-3p binding sites, which are close to the stop codon, thus accelerating MR protein degradation [50]. Although decrease of MR expression was relatively weak (50% decrease of protein level), this action of miRNAs on the fine post-transcriptional control of MR expression is reminiscent of the role of miRNAs as buffers against variation in gene expression, as described by Ebert *et al*

[52]. Our study highlighted the role of these miRNAs, which could impair MR signaling in KC3AC1 cells. miR-30c-2-3p belongs to the miR-30 family involved in various renal diseases [53, 54]. In addition, it has been reported that levels of miR-30 family members (including miR-30a, miR-30c, and miR-30e) increased in plasma of contrast-induced nephropathy (CIN) rats, suggesting that miR-30 family might serve as early biomarkers for CIN [55]. Finally, miR-30c was also shown to be involved in regulation of tubular cells apoptosis in cisplatin-induced nephrotoxicity [56]. Thus, our results add to the diversity of miR-30 family actions in renal pathophysiology. miR-324-5p is located on chromosome 11 and inhibits diverse functions in cancer. A recent study demonstrated that miR-324-5p plays a protective role against hepatocellular carcinoma [57]. Another study indicated a significant upregulation of miR-324-5p in lung cancer cells and demonstrated that it promotes proliferation [58]. Although few data are available on its action in the kidney, we could not exclude a role of this miRNA in other MR target tissues. Indeed, miR-324-5p was demonstrated to contribute to seizure onset by repressing the expression of Kv4.2, a potassium channel, in the central nervous system, [59] where MR plays a neuroprotective role [60, 61]. Moreover, miR-324-5p was shown to inhibit mitochondrial fission, apoptosis and myocardial infarction [62] through downregulation of Mtf1, whereas MR is expressed in cardiac myocyte and its activation is associated with myocardial hypertrophy and fibrosis [63, 64]. To address the physiologic relevance of our study, we treated mice for 4 h with furosemide, a diuretic known to increase the relative luminal hypertonicity and to decrease MR expression [14] and showed that miR-324-5p and miR-30c-2-3p expressions were increased in kidneys of these animals by 2- to 4-fold, respectively. This increase was higher than that observed in KC3AC1 cells, suggesting that their expression may also be increased in other nephronic segments. Finally, our group has identified a restricted temporal window during renal development where MR signaling is ineffective due to specific downregulation of MR expression in the perinatal period compared to lung where MR expression is constant [65]. In this context it would be interesting to evaluate whether such regulatory mechanisms are implicated in the regulation of MR expression within the perinatal period. Altogether, our study has deciphered a novel regulatory mechanism involving the recruitment of miRNAs in the control of renal MR expression under hypertonicity, resulting in alteration of MR signaling with a potential impact on sodium reabsorption. Our findings may also account for (patho)physiological situations affecting MR signaling in nephropathies [10] such as diabetic nephropathies or partial aldosterone resistance in newborn [13]. Given that miRNAs are also secreted in body fluids [66], these miRNAs may be quantified in plasma and urine of patients presenting with an altered salt and water balance or with diabetic nephropathy and might be used as non-invasive biomarkers to follow the evolution of renal diseases.

Declarations

Funding This research program was supported by Inserm, Université Paris-Saclay, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR EPHIMIR 11-BSV1-028-01; ANR PERIMIRE 20-CE14-0015). Thi An Vu was the recipient of a Otsuka Fellowship from the Société Francophone de Néphrologie Dialyse et Transplantation during her Master 2 Degree and the recipient of a Doctoral Fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI).

Conflict of interest The authors declare they have no competing interests.

Availability of data and material Not applicable

Code availability Not applicable

Ethics approval Mice were bred according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The animal facility was granted approval (no. C94-043-12) by the Ministère de l'Agriculture, France. All procedures were approved by the local ethic committee CAPSud (N°2012-021).

Consent to participate Not applicable

Consent for publication Not applicable

Acknowledgements The authors are grateful to V. Keo for technical assistance during TLDA analysis.

Authors contributions TAV, SV, ML, LM, PK, AB contributed to the conception and design of the research; TAV, IL, LC, LA-L, VS, MS, IH, YM, SF, JB, GC conducted experiments; TAV, IL, VS, SV, ML, GC acquired, analyzed data and interpreted results; TAV, ML, SV wrote the original manuscript draft; all authors read and approved the final manuscript.

References

1. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, et al (2007) The Mineralocorticoid Receptor: Insights into its Molecular and (Patho)Physiological Biology. *Nucl Recept Signal* 5:nrs.05012. <https://doi.org/10.1621/nrs.05012>
2. Masilamani S, Kim G-H, Mitchell C, et al (1999) Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β , and γ subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104:R19–R23. <https://doi.org/10.1172/JCI7840>
3. Löffing J, Korbmacher C (2009) Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 458:111–135. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0656-0>
4. Nesterov V, Dahlmann A, Krueger B, et al (2012) Aldosterone-dependent and -independent regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) in mouse distal nephron. *AJP: Renal Physiology* 303:F1289–F1299. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00247.2012>
5. Pearce D (2001) The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends Endocrinol Metab* 12:341–347. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(01\)00439-8](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00439-8)
6. Náráy-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, et al (1999) *sgk* is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na^+ channels. *J Biol Chem* 274:16973–16978. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16973>
7. Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, et al (2005) A Novel Role for Glucocorticoid-induced Leucine Zipper Protein in Epithelial Sodium Channel-mediated Sodium Transport. *J Biol Chem* 280:39970–39981. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508658200>
8. Martinerie L, Viengchareun S, Delezoide A-L, et al (2009) Low Renal Mineralocorticoid Receptor Expression at Birth Contributes to Partial Aldosterone Resistance in Neonates. *Endocrinology* 150:4414–4424. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1498>
9. Shibata H, Itoh H (2012) Mineralocorticoid receptor-associated hypertension and its organ damage: clinical relevance for resistant hypertension. *Am J Hypertens* 25:514–523. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.245>
10. Quinkler Marcus, Zehnder Daniel, Eardley Kevin S., et al (2005) Increased Expression of Mineralocorticoid Effector Mechanisms in Kidney Biopsies of Patients With Heavy Proteinuria. *Circulation* 112:1435–1443. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.539122>
11. Doucet A, Katz AI (1981) Mineralocorticoid receptors along the nephron: [^3H]aldosterone binding in rabbit tubules. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 241:F605–F611
12. Lombès M, Farman N, Oblin ME, et al (1990) Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1086–1088
13. Viengchareun S, Kamenicky P, Teixeira M, et al (2009) Osmotic Stress Regulates Mineralocorticoid Receptor Expression in a Novel Aldosterone-Sensitive Cortical Collecting Duct Cell Line. *Mol Endocrinol* 23:1948–1962. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0095>
14. Viengchareun S, Lema I, Lamribet K, et al (2014) Hypertonicity Compromises Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling through Tis11b-Mediated Post-Transcriptional Control. *JASN* 25:2213–2221. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013091023>
15. Lema I, Amazit L, Lamribet K, et al (2017) RNA-binding protein HuR enhances mineralocorticoid signaling in renal KC3AC1 cells under hypotonicity. *Cell Mol Life Sci* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2594-x>
16. Lema I, Amazit L, Lamribet K, et al (2017) HuR-Dependent Editing of a New Mineralocorticoid Receptor Splice Variant Reveals an Osmoregulatory Loop for Sodium Homeostasis. *Scientific Reports* 7:4835. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04838-8>
17. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
18. Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15:509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
19. Morlando M, Ballarino M, Gromak N, et al (2008) Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol* 15:902–909. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1475>

20. Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11:597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
21. Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, et al (2013) MicroRNAs in the kidney: novel biomarkers of acute kidney injury. *Nefrologia* 33:826–834
22. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, et al (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769–773. <https://doi.org/10.1038/nature03315>
23. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, et al (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455:58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
24. Hashimoto Y, Akiyama Y, Yuasa Y (2013) Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer. *PLoS One* 8:e62589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062589>
25. van Balkom BWM, Pisitkun T, Verhaar MC, Knepper MA (2011) Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney Int* 80:1138–1145. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.292>
26. Miranda KC, Bond DT, McKee M, et al (2010) Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int* 78:191–199. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.106>
27. Schena FP, Serino G, Sallustio F (2014) MicroRNAs in kidney diseases: new promising biomarkers for diagnosis and monitoring. *Nephrol Dial Transplant* 29:755–763. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft223>
28. Mukhadi S, Hull R, Mbita Z, Dlamini Z (2015) The Role of MicroRNAs in Kidney Disease. *Non-Coding RNA* 1:192–221. <https://doi.org/10.3390/ncrna1030192>
29. Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G (2015) MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nat Rev Nephrol* 11:23–33. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.202>
30. Butterworth MB (2015) MicroRNAs and the regulation of aldosterone signaling in the kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 308:C521–527. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00026.2015>
31. Söber S, Laan M, Annilo T (2010) MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391:727–732. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.128>
32. Park E-J, Jung HJ, Choi H-J, et al (2018) miR-34c-5p and CaMKII are involved in aldosterone-induced fibrosis in kidney collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 314:F329–F342. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00358.2017>
33. Elvira-Matelot E, Zhou X, Farman N, et al (2010) Regulation of WNK1 Expression by miR-192 and Aldosterone. *JASN* 21:1724–1731. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009111186>
34. Edinger RS, Coronello C, Bodnar AJ, et al (2014) Aldosterone regulates microRNAs in the cortical collecting duct to alter sodium transport. *J Am Soc Nephrol* 25:2445–2457. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013090931>
35. Liu X, Edinger RS, Klemens CA, et al (2017) A MicroRNA Cluster miR-23-24-27 Is Upregulated by Aldosterone in the Distal Kidney Nephron Where it Alters Sodium Transport. *J Cell Physiol* 232:1306–1317. <https://doi.org/10.1002/jcp.25599>
36. Lin D-H, Yue P, Pan C, et al (2011) MicroRNA 802 stimulates ROMK channels by suppressing caveolin-1. *J Am Soc Nephrol* 22:1087–1098. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010090927>
37. Lin D-H, Yue P, Zhang C, Wang W-H (2014) MicroRNA-194 (miR-194) regulates ROMK channel activity by targeting intersectin 1. *Am J Physiol Renal Physiol* 306:F53–60. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00349.2013>
38. Mannironi C, Camon J, De Vito F, et al (2013) Acute stress alters amygdala microRNA miR-135a and miR-124 expression: inferences for corticosteroid dependent stress response. *PLoS ONE* 8:e73385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073385>
39. Nossent AY, Hansen JL, Doggen C, et al (2011) SNPs in microRNA binding sites in 3'-UTRs of RAAS genes influence arterial blood pressure and risk of myocardial infarction. *Am J Hypertens* 24:999–1006. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.92>
40. Yang C, Ma X, Guan G, et al (2019) MicroRNA-766 promotes cancer progression by targeting NR3C2 in hepatocellular carcinoma. *FASEB J* 33:1456–1467. <https://doi.org/10.1096/fj.201801151R>

41. Ozbaki-Yagan N, Liu X, Bodnar AJ, et al (2020) Aldosterone-induced microRNAs act as feedback regulators of mineralocorticoid receptor signaling in kidney epithelia. *The FASEB Journal* 34:11714–11728. <https://doi.org/10.1096/fj.201902254RR>
42. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4:. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
43. Vejnar CE, Zdobnov EM (2012) miRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength. *Nucleic Acids Res* 40:11673–11683. <https://doi.org/10.1093/nar/gks901>
44. Jiang P, Collier H (2012) Functional interactions between microRNAs and RNA binding proteins. *Microna* 1:70–79. <https://doi.org/10.2174/2211536611201010070>
45. Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM (2000) Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F1006-1012. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.6.F1006>
46. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, et al (1999) Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2538–2542. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2538>
47. Ko BC, Ruepp B, Bohren KM, et al (1997) Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* 272:16431–16437. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16431>
48. Fornes O, Castro-Mondragon JA, Khan A, et al (2020) JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 48:D87–D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>
49. Viengchareun S, Lema I, Lamribet K, et al (2014) Hypertonicity Compromises Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling through Tis11b-Mediated Post-Transcriptional Control. *JASN* 25:2213–2221. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013091023>
50. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, et al (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27:91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>
51. Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18:504–511. <https://doi.org/10.1101/gad.1184404>
52. Ebert MS, Sharp PA (2012) Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 149:515–524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.005>
53. Mao L, Liu S, Hu L, et al (2018) miR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease. *Biomed Res Int* 2018:9623412. <https://doi.org/10.1155/2018/9623412>
54. Wu J, Zheng C, Fan Y, et al (2014) Downregulation of microRNA-30 facilitates podocyte injury and is prevented by glucocorticoids. *J Am Soc Nephrol* 25:92–104. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012111101>
55. Gutiérrez-Escolano A, Santacruz-Vázquez E, Gómez-Pérez F (2015) Dysregulated microRNAs involved in contrast-induced acute kidney injury in rat and human. *Ren Fail* 37:1498–1506. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1077322>
56. Du B, Dai X-M, Li S, et al (2017) MiR-30c regulates cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells by targeting Bnip3L and Hspa5. *Cell Death Dis* 8:e2987. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.377>
57. Cao L, Xie B, Yang X, et al (2015) MiR-324-5p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion by Counteracting ECM Degradation through Post-Transcriptionally Downregulating ETS1 and SP1. *PLoS One* 10:e0133074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133074>
58. Kuo W-T, Yu S-Y, Li S-C, et al (2016) MicroRNA-324 in Human Cancer: miR-324-5p and miR-324-3p Have Distinct Biological Functions in Human Cancer. *Anticancer Res* 36:5189–5196. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11089>
59. Gross C, Yao X, Engel T, et al (2016) MicroRNA-Mediated Downregulation of the Potassium Channel Kv4.2 Contributes to Seizure Onset. *Cell Rep* 17:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.074>
60. Le Menuet D, Viengchareun S, Muffat-Joly M, et al (2004) Expression and function of the human mineralocorticoid receptor: lessons from transgenic mouse models. *Mol Cell Endocrinol* 217:127–136. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.045>

61. Oyamada N, Sone M, Miyashita K, et al (2008) The role of mineralocorticoid receptor expression in brain remodeling after cerebral ischemia. *Endocrinology* 149:3764–3777. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1770>
62. Wang K, Zhang D-L, Long B, et al (2015) NFAT4-dependent miR-324-5p regulates mitochondrial morphology and cardiomyocyte cell death by targeting Mtf1. *Cell Death Dis* 6:e2007. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.348>
63. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT (1993) Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 25:563–575. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1993.1066>
64. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, et al (2002) Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 105:677–679. <https://doi.org/10.1161/hc0602.104675>
65. Martinerie L, Viengchareun S, Meduri G, et al (2011) Aldosterone postnatally, but not at birth, is required for optimal induction of renal mineralocorticoid receptor expression and sodium reabsorption. *Endocrinology* 152:2483–2491. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1460>
66. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56:1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>

Figure legends

Fig. 1 Schematic representation of *Nr3c2* (MR) 3'-UTR, expression of *Nr3c2* (MR) and miRNA candidates in renal KC3AC1 cells under hypertonicity. **a** Location of predicted binding sites for miRNAs in the murine *Nr3c2* (MR) 3'-UTR, 2.78 kbp, positioned after the stop codon TGA, arbitrarily set at +1. **b, c** RT-qPCR analysis of renal MR and expression of miRNA candidates from TLDA (**b**) and miRNAs-seq (**c**) approaches. KC3AC1 cells were grown for 7 days in complete medium then cells were exposed to isotonicity (Iso) or hypertonicity (Hyper) for 6 h. MR transcript and miRNA levels under hypertonicity are expressed as a percentage of *Nr3c2* (MR) mRNA or miRNA levels under isotonicity (arbitrarily set at 100%). Data are means±SEMs from 3 independent experiments performed in 6 replicates (n=18); isotonic condition (open circle, o), hypertonic condition (black circle, •). NS = not significant, *** P <0.001, **** P <0.0001.

Fig. 2 miR-324-5p functionally interacts with *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) transcripts. The murine *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) 3'-UTR were cloned downstream of the pMIR-REPORT luciferase vector. **a, c** HEK293T cells were transiently transfected, as described in Materials and Methods Section, with pMIR-luciferase plasmid (pMIR-Luc) fused to *Nr3c2* (MR) or *Elavl1* (HuR) 3'-UTR (40 ng/well of 96-well plates) and incubated with increasing concentrations (10, 50, 100 nM) of negative control Mimics (CTR Mimic) or of 324-5p Mimics. Luciferase activities were measured 24 h after transfection and normalized to β -galactosidase activities. **b, d** HEK293T cells were transiently transfected with pMIR-Luc fused to *Nr3c2* (MR) or *Elavl1* (HuR) 3'-UTR (40 ng/well of 96-well plates) and 100 nM of CTR or 324-5p Mimics or with 100 nM of CTR or 324-5p Inhibitors. Luciferase activities were measured 24 h after transfection and normalized to β -galactosidase activities. Data are means±SEMs (n=8). NS = not significant, *** P <0.001, **** P <0.0001 compared to luciferase activity of pMIR-Luc fused to *Nr3c2* (MR) or *Elavl1* (HuR) 3'-UTR without Mimics (**a, c**) or with CTR Mimic or CTR inhibitor (**b, d**), arbitrarily set at 100%.

Fig. 3 miR-30c-2-3p functionally interacts with *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) transcripts. The murine *Nr3c2* (MR) and *Elavl1* (HuR) 3'-UTR were cloned downstream of the pMIR-REPORT luciferase vector. **a, c** HEK293T cells were transiently transfected, as described in Materials and Methods Section, with pMIR-luciferase plasmid (pMIR-Luc) fused to *Nr3c2* (MR) or *Elavl1* (HuR) 3'-UTR (40 ng/well of 96-well plates) and incubated with increasing concentrations (0.5, 1, 5 nM) of negative control Mimics (CTR Mimic) or 30c-2-3p Mimics. Luciferase activities were measured 24 h after transfection and normalized to β -galactosidase activities. **b, d** HEK293T cells were transiently transfected with pMIR-Luc fused to *Nr3c2* (MR) or *Elavl1* (HuR) 3'-UTR (40 ng/well of 96-well plates) and 10 nM of control (CTR) or 30c-2-3p Mimics and with 10 nM of control (CTR) or 30c-2-3p Inhibitors. Luciferase activities were measured 24 h after transfection and normalized to β -galactosidase activities. Data are means±SEMs (n=8). NS = not significant, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001 compared to luciferase activity of pMIR-Luc fused to *Nr3c2* (MR) or *Elavl1* (HuR) 3'-UTR without Mimics (**a, c**) or with CTR Mimics or CTR Inhibitors (**b, d**), arbitrarily set at 100%.

Fig. 4 Cooperativity between miR-324-5p or miR-30c-2-3p and Tis11b on *Nr3c2* (MR) 3'-UTR. **a** Location of A-U rich response elements (ARE) motifs [14] and of putative binding sites for miR-324-5p and miR-30c-2-3p in mouse *Nr3c2* (MR) 3'-UTR, positioned after the stop codon TGA, arbitrarily set at +1. HEK293T cells were transiently transfected, as described in Materials and Methods Section, with pMIR-luciferase plasmid (pMIR-Luc) fused to *Nr3c2* (MR) 3'-UTR (40 ng/well of 96-well plates) with or without a Tis11b-encoding plasmid (10 ng/well) and in the absence or presence of 10 nM Control Mimics (CTR mimic) or of 10 nM 324-5p Mimics (**b**) or 0.5 nM 30c-2-3p Mimics (**c**). Luciferase activities were measured 24 h after transfection and normalized to β -galactosidase activities. Data are means \pm SEMs (n=8). NS = not significant, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001 compared to luciferase activity of pMIR-Luc fused to *Nr3c2* (MR) without Mimics, Tis11b or with CTR Mimics (CTR Mimic), arbitrarily set at 100%. ξP <0.05 $\xi\xi P$ <0.001 and $\xi\xi\xi P$ <0.0001 between the 2 conditions indicated by line.

Fig. 5 miR-30c-2-3p overexpression decreases MR expression in renal KC3AC1 cells and compromises MR-mediated target gene expression. Renal KC3AC1 cells were transfected with 10 nM Mimics or 10 nM negative Control Mimics (CTR mimic). **a** Specific overexpression of miR-30c-2-3p in renal KC3AC1 cells was confirmed by RT-qPCR. **b** Quantitative RT-qPCR of endogenous *Nr3c2* (MR) expression, analyzed 18 h after transfection. Data are means \pm SEMs (n=12). NS=not significant, **** P <0.0001 compared to CTR Mimics, arbitrarily set at 100%. **c** Western blot analysis of MR expression, 48 h following transfection of CTR Mimics or 30c-2-3p Mimics (left panel) and quantification of the corresponding signals (right panel) in which MR expression with CTR Mimics was arbitrarily set at 100%. Data are means \pm SEMs (n=6). **d, e** Renal KC3AC1 cells were transfected with 10 nM Inhibitors or negative Control Inhibitors (CTR inhibitor). **d** Specific overexpression of miR-30c-2-3p in renal KC3AC1 cells was confirmed by RT-qPCR. **e** Quantitative RT-qPCR of endogenous *Nr3c2* (MR) expression, analyzed 18 h after transfection. Data are means \pm SEMs (n=6). NS=not significant, **** P <0.0001 compared to CTR inhibitor, arbitrarily set at 100%. **f, g** Overexpression of miR-30c-2-3p prevented aldosterone-induced expression of *Tsc22d3* (Gilz) (**f**) or of *Sgkl* (**g**) in renal KC3AC1 cells. KC3AC1 cells were deprived for 24 h in minimal medium then cells were transfected with 10 nM CTR Mimics or 10 nM 30c-2-3p Mimics. Eighteen hours later, cells were stimulated with 10 nM Aldosterone for 1 h then *Tsc22d3* (Gilz) or *Sgkl* expression was measured by RT-qPCR. Data are means \pm SEMs (n=6). NS=not significant, ** P <0.01, **** P <0.0001 compared to condition without aldosterone stimulation. ξP <0.05 $\xi\xi P$ <0.001 and $\xi\xi\xi P$ <0.0001 between the 2 conditions indicated by line.

Fig. 6 Impairment of MR signaling in KC3AC1 cells stably expressing miR-324-5p. miR-324-5p (**a, d**), *Nr3c2* (MR) (**b, e**) and *Elavl1* (HuR) (**c, f**) expression were determined by RT-qPCR, 48 h after doxycycline induction (1 μ g/ml) in KC3AC1 clones stably-transduced with lentiviral particules expressing inducible scrambled miRNAs (Sm-A1 clone, left panels) or miR-324-5p (Sh-H8 clone, right panels). Data are means \pm SEMs from 2 independent experiments performed in 6 replicates (n=12). NS = not significant, *** P <0.001, **** P <0.0001 compared to the condition in absence of doxycycline, arbitrarily set at 100%. (**g, h**) Sm-A1 and Sh-H8 clones were deprived in minimal medium for 48 h and incubated for 48 h with 1 μ g/ml doxycycline. Thereafter, Sm-A1 and Sh-H8 clones were stimulated for 1 h with 10 nM aldosterone and *Tsc22d3* (Gilz) expression (**g, h**) was quantified by RT-qPCR where basal Gilz expression in renal cells, in the absence of DOX and aldosterone, was arbitrarily set at 100%. Data are means \pm SEMs from 3 independent experiments performed in 6 replicates per condition (n=18). NS= not significant. * P <0.05 ** P <0.01 *** P <0.001 **** P <0.0001 compared to the condition without aldosterone stimulation, arbitrarily set at 100%. $\xi\xi\xi$ indicate P <0.001 between the 2 conditions indicated by line.

Fig. 7 Treatment of mice with furosemide increases renal miR-324-5p and miR-30c-2-3p expression *in vivo*. Furosemide (40 mg/kg), an NKCC2 inhibitor, was administered for 4 h before sacrifice in order to induce a relative luminal hypertonicity. RT-qPCR of miR-324-5p (**a**) and miR-30c-2-3p (**b**) expression in the kidneys of treated-mice compared to control mice, arbitrarily set at 100%. Data are means±SEMs (n=5-6 animals). ** $P < 0.01$ compared to control mice.

Fig. 8 Proposed model for the post-transcriptional control of renal MR expression by miRNAs under hypertonicity and its impact on MR signaling. Under hypertonicity, the transcription factor TonEBP binds TonE elements located in the regulatory regions of *mir324* and *mir30c-2* genes which encode miR-324-5p and miR-30c-2-3p, respectively. Hypertonicity stimulates transcription of pri-miRNAs of miR-324-5p and of miR-30c-2-3p and their maturation. Thereafter, these miRNAs can repress MR expression directly by interacting with *Nr3c2* (MR) 3'-UTR or indirectly by interacting with *Elavl1* (HuR), a RNA Binding Protein, which was shown to stabilize *Nr3c2* (MR) transcript under hypotonicity[15]. Moreover, these miRNAs can cooperate with Tis11b, a RNA Binding Protein, which was previously shown to accelerate destabilization of MR transcripts[14]. Thus, hypertonicity may compromise MR signaling.

Supplementary figure legends

Supplementary Fig. 1 Morphology of Sm-A1 and Sh-H8 clones. Cells were grown for 5 days then were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycycline for 48 h. **a, c** Cellular morphology of Sm-A1 clone (**a**) and Sh-H8 clone (**c**) observed with a phase-contrast microscope. Clones maintain a cuboid shape characteristics of epithelial cells and form domes at confluency suggesting a transepithelial ionic transport. **b, d** Sh-A1 (**b**) and Sh-H8 clones (**d**) were observed with a fluorescent microscope after 48 h of doxycycline stimulation. Fluorescence of turbo Red Fluorescent Protein allowed easy identification of transduced KC3AC1 cells, which should express either scrambled miRNAs (upper panels) or miR-324-5p (lower panels).

Supplementary Fig. 2 Identification of half sites of Tonicity response Elements (TonEs) in regulatory sequences of miRNAs loci (red box). **a** Schematic representation of *mir30c-2* gene on murine chromosome 1 (green bar) and location of TonEs, which were identified with Jaspar software in *mir30c-2* promoter region (blue bar). **b** Schematic representation of *mir324* gene on murine chromosome 11 (green bar) and location of TonEs, which were identified with Jaspar software in *mir324* promoter region (violet bar). The bent arrow represents the transcription start site (TSS) of *mir30c-2* (**a**) and *mir324* genes (**b**), encoding miR-30c-2-3p and miR-324-5p, respectively.

Supplementary Tables

Table 1 miRNA Stem-loop and TaqMan probes for miRNAs RT-qPCR

miRNAs	Accession Number	Sequences	ID
mmu-miR-135a-5p	MIMAT0000147	TATGGCTTTTATTCCCTATGTGA	000460
mmu-miR-28a-3p	MIMAT0004661	CACTAGATTGTGAGCTGCTGGA	002545
mmu-miR-30c-2-3p	MIMAT0005438	CTGGGAGAAGGCTGTTACTCT	002110
mmu-miR-324-5p	MIMAT0000555	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT	000539
mmu-miR-335-5p	MIMAT0000766	TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT	000546
mmu-miR-16	MIMAT0000527	TAGCAGCACGTAATATTGGCG	000391
snoRNA 202	AF357327	GCTGTACTGACTTGATGAAAGTACTTTTGAACCCCTTTCCATCT GATG	001232

Table 2 Primer sequences

All primer sequences are shown from 5' to 3'.

Table 2a Primer sequences used for RNAs RT-qPCR

Name	Accession Numbers	Amplicon size (pb)	Forward primer	Reverse primer
<i>Nr3c2</i> (MR)	M36074	153	ATGGAAACCACACGGTGACCT	AGCCTCATCTCCACACACCAAG
<i>zfp361l</i> (Tis11b)	NM_007564.3	100	CGACACACCAGATCCTAGTCCTT	TGCATAAAAACCTTCGCTCAAGTCA
<i>Elavl1</i> (HuR)	NM_010485.3	87	CAGCCAATCCCAACCAGAA	TGGTGTACAGGGCCTCCAAA
<i>Tsc22d3</i> (Gilz)	NM_010286.3	79	CTGCTGTGGAGTTTGTGACATACTAG	CCAGGCAGGCACCTTCTAAGCT
<i>Sgk1</i>	AF205855	150	TCACTTCTCATTCCAGACCCG	ATAGCCCAAGGCCTGGCTA
<i>18S</i>	X00686	66	CCCTGCCCTTTGTACACACC	CGATCCGAGGGCCTCACTA
<i>Rplp0</i> (36b4)	NM_007475.5	128	AGCGCGTCTGGCATTGTCTGT	GGGCAGCAGTGGTGGCAGCAGG

Table 2b Primer sequences used for cloning the pMIR-mHuR-3'-UTR

Name	Forward primer	Reverse primer
pMIR-mHuR-3'UTR	ACGCACTAGTCGGAATAGATAATTAAGAGTGA	ACGCAGCTTCCACCTTCTTTTCTGA

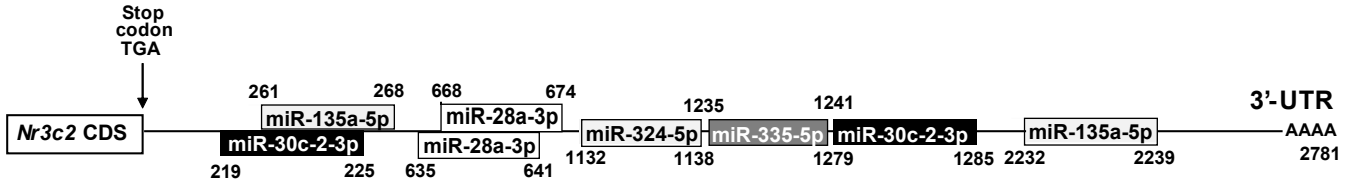
Table 3c miRNAs Mimics & Inhibitors references for transfection

Name	ID
324-5p Mimic	MC10253
30c-2-3p Mimic	MC12646
negative control Mimic	
324-5p Inhibitor	MH10253
30c-2-3p Inhibitor	MH12646
negative control Inhibitor	

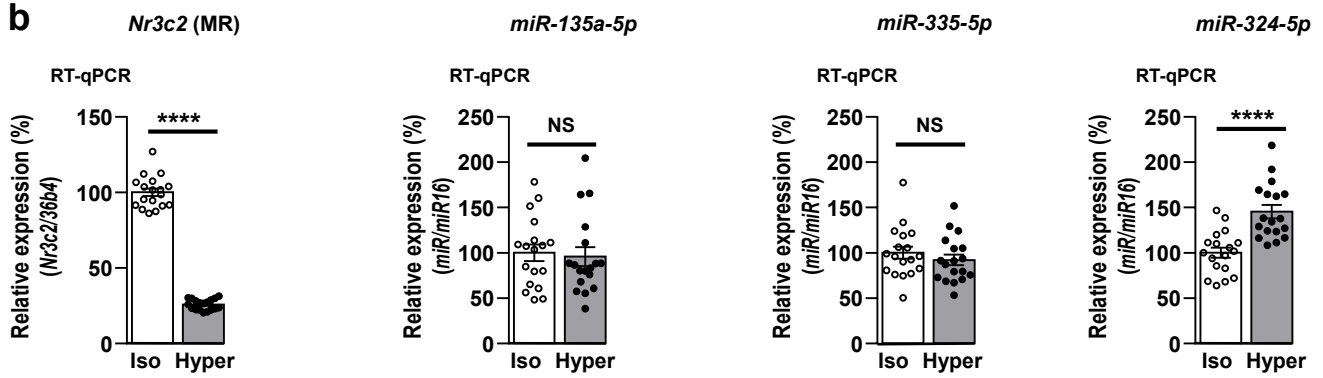
Table 4 Antibodies used for Western blot analysis

Name (Provider)	Species	Protein	Molecular weight (kDa)	Dilution
Primary antibodies				
39N (developed by our lab)	Rabbit	MR	130 kDa	1:1000 (cells)
α -Tubulin (Sigma)	Mouse	α -Tubulin	50 kDa	1:5000
Secondary antibodies				
Dylight Anti-Rabbit 800 (Fisher Scientific)	Goat	Rabbit IgG		1:10000
Dylight Anti-Mouse 680 (Fisher Scientific)	Rabbit	Mouse IgG		1:10000

a



b



c

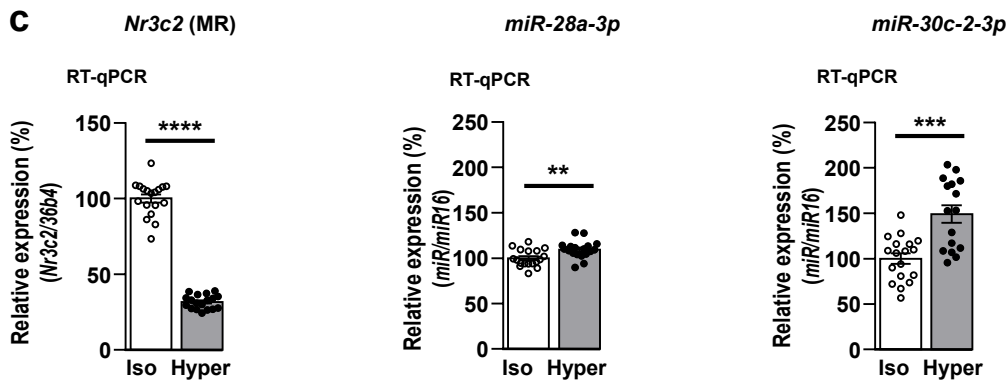


Fig 1.

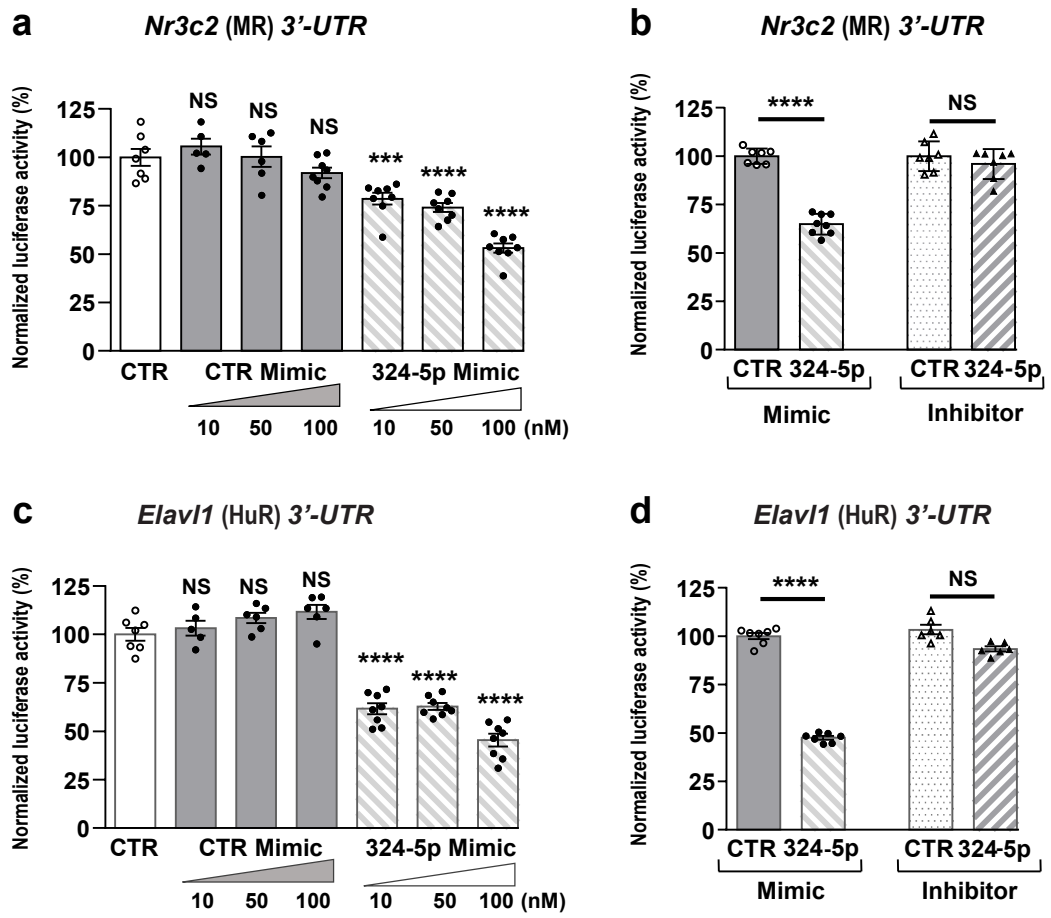


Fig. 2

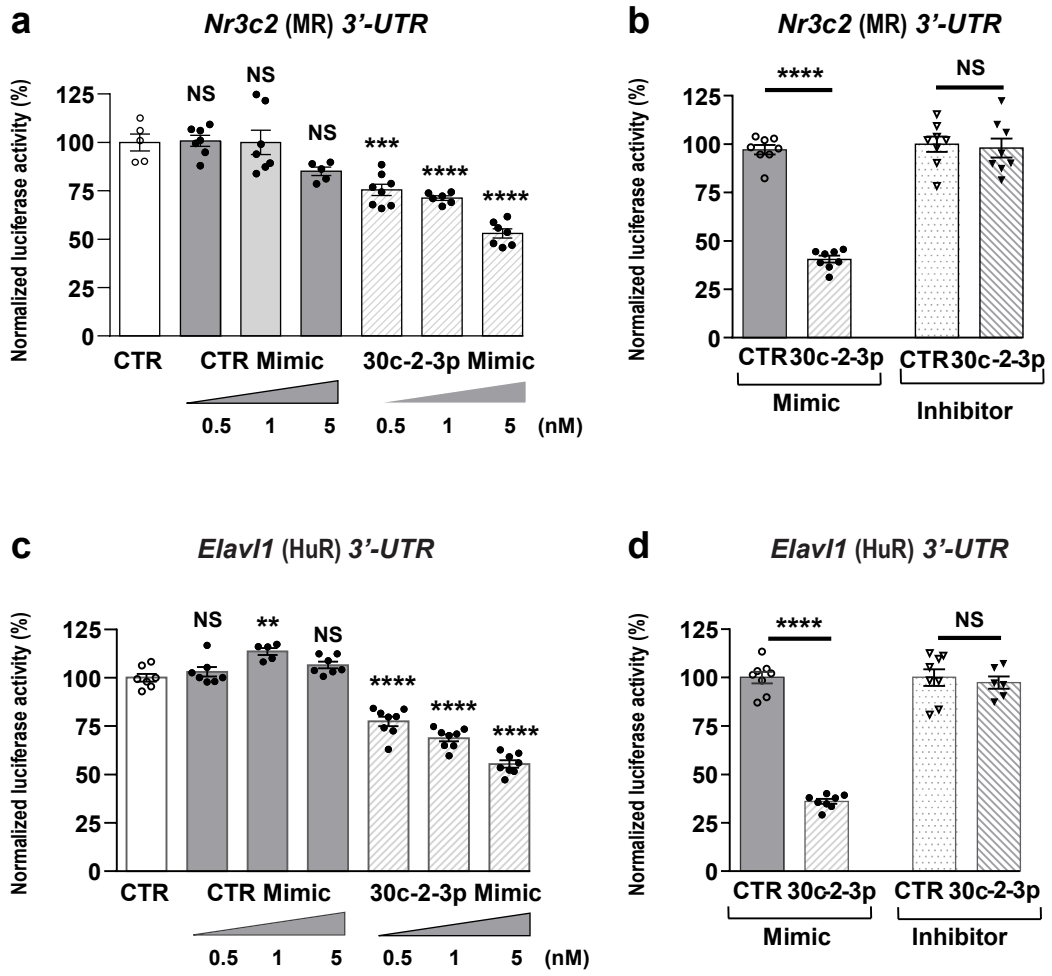


Fig. 3

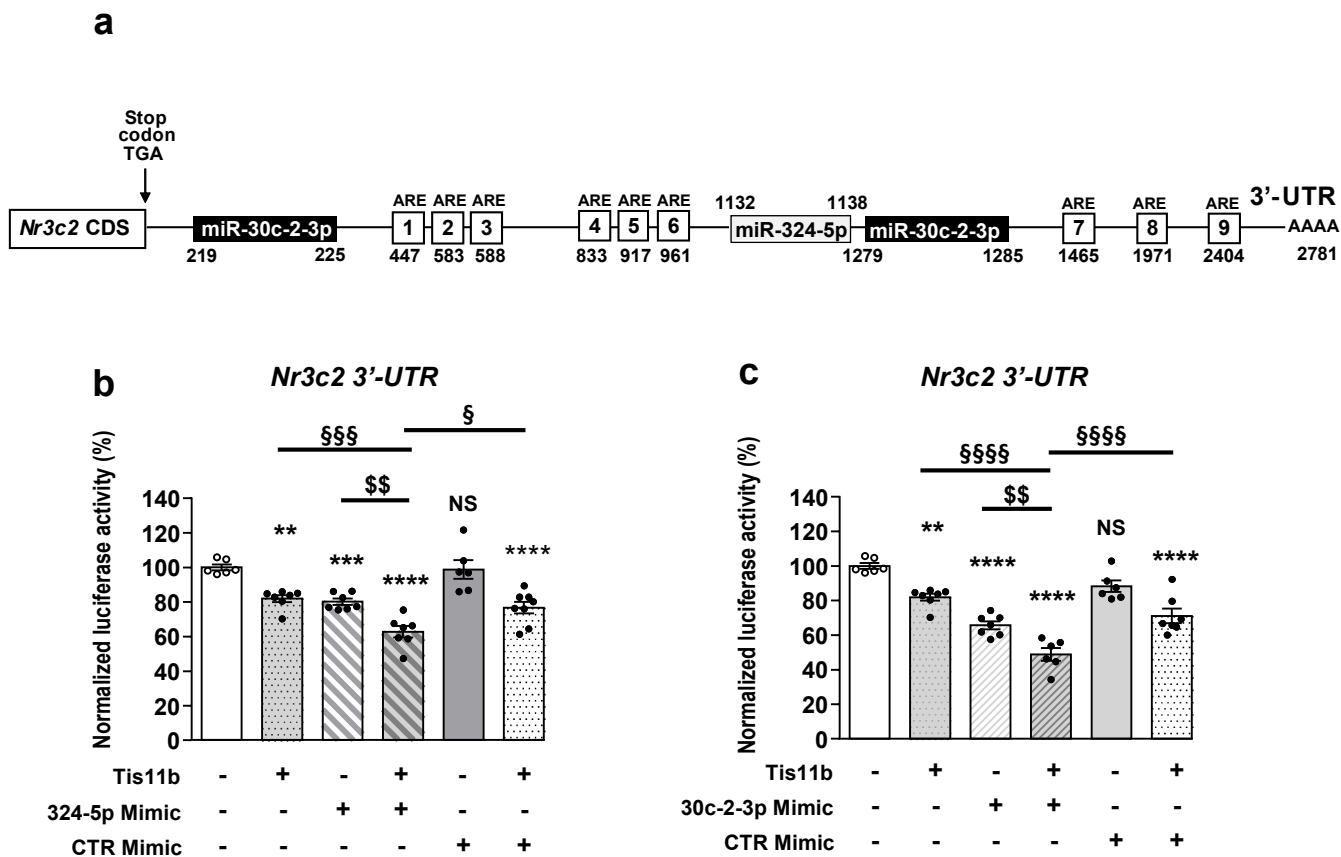


Fig. 4

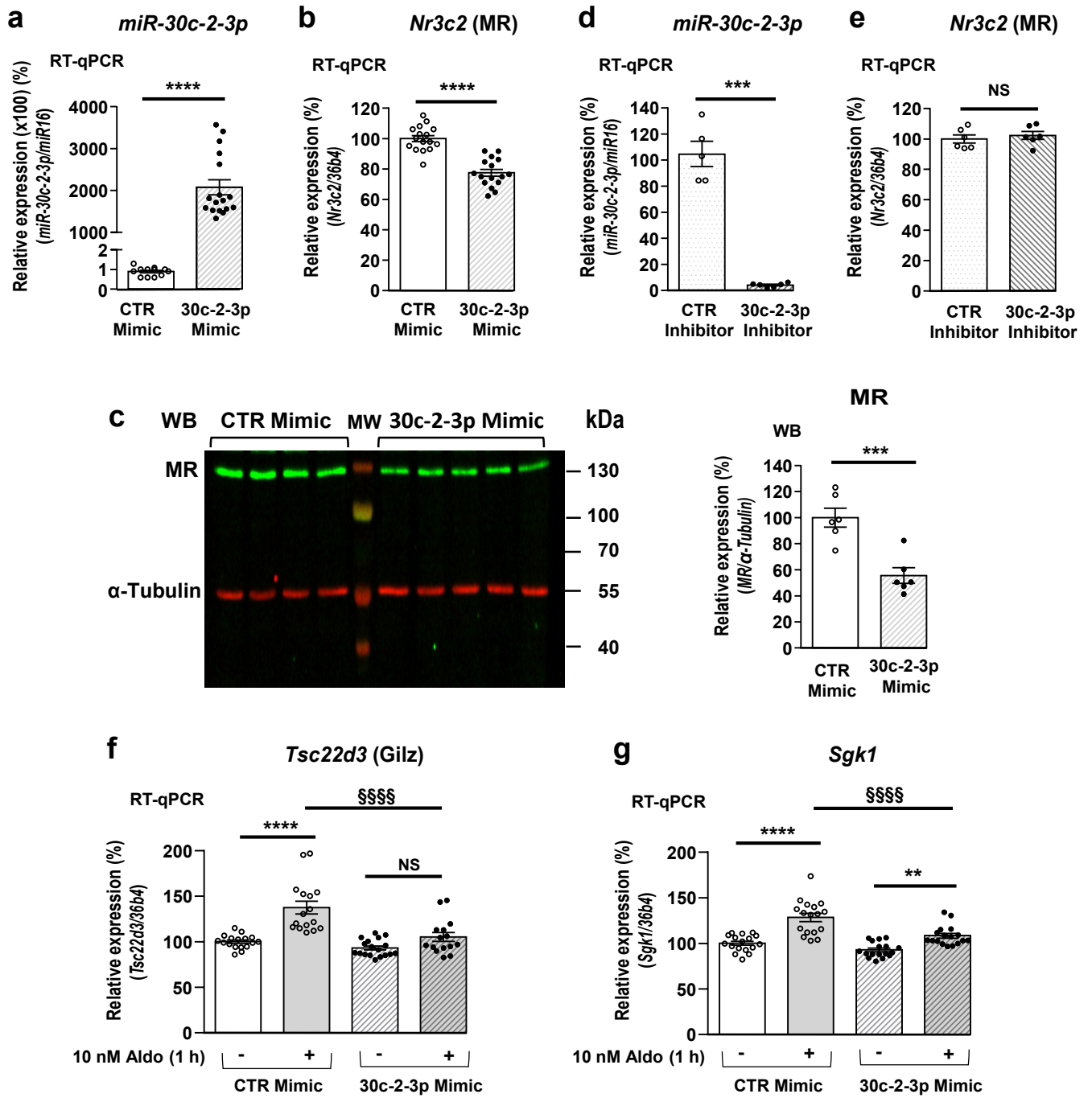


Fig. 5

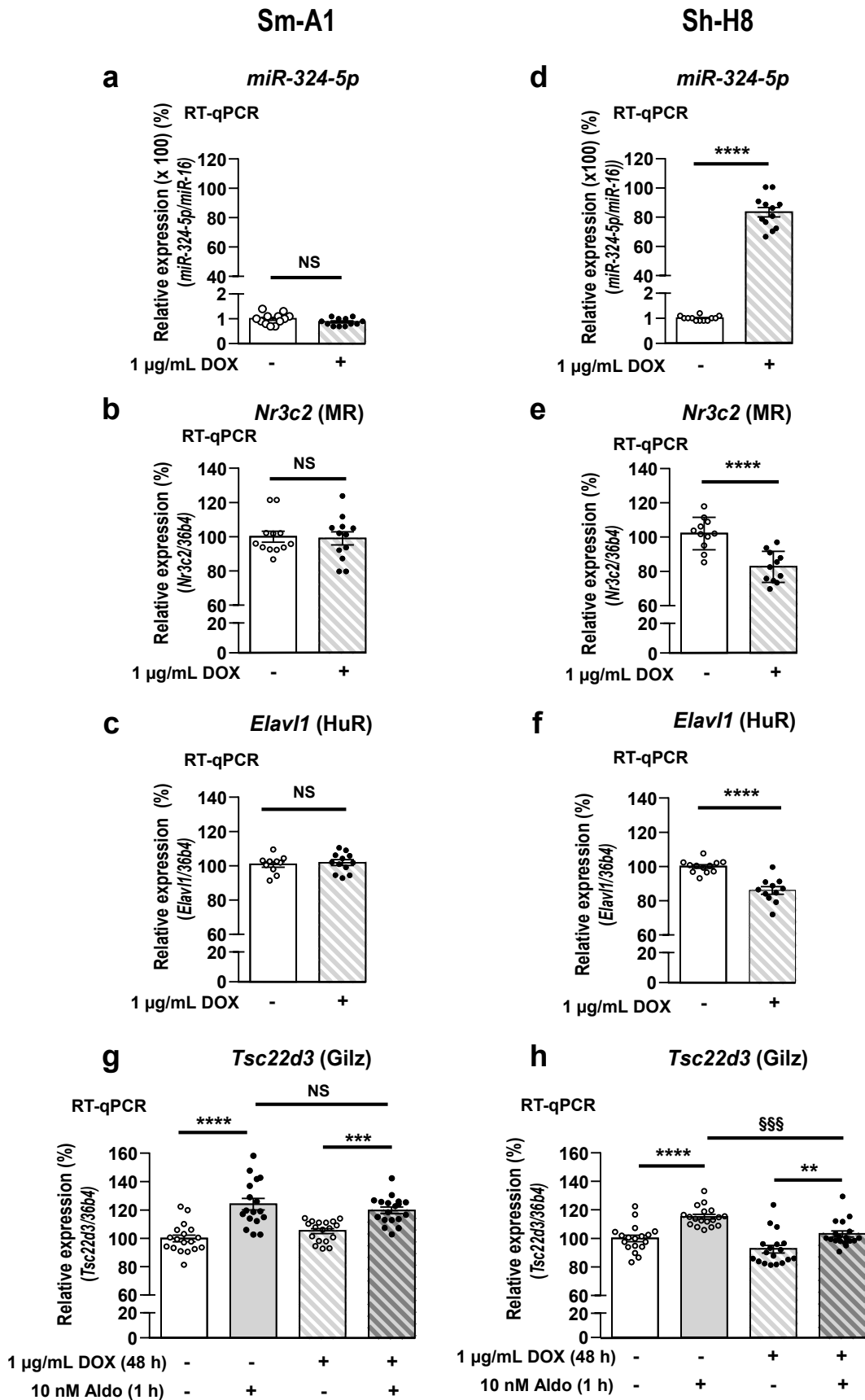


Fig. 6

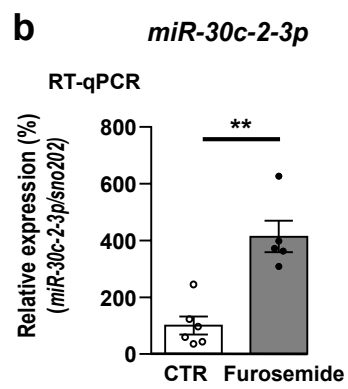
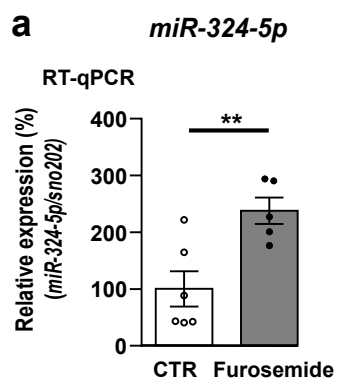


Fig. 7

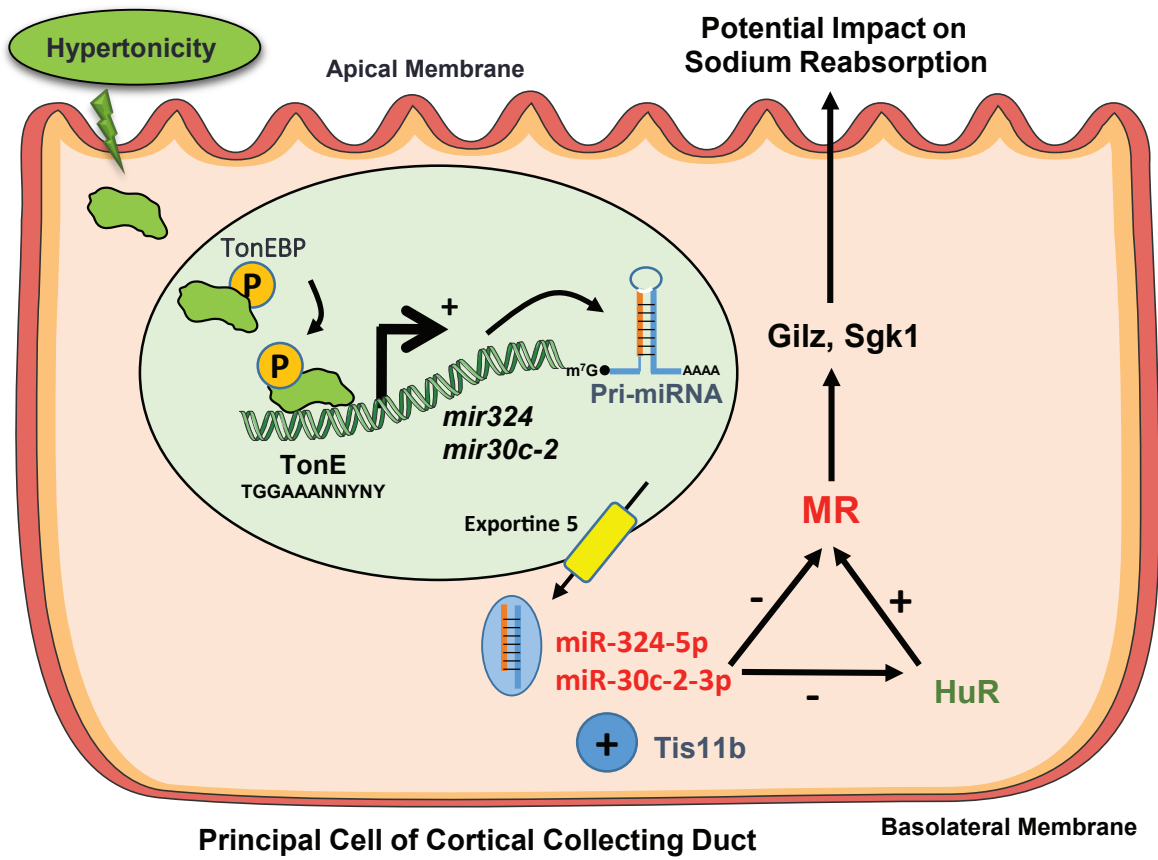
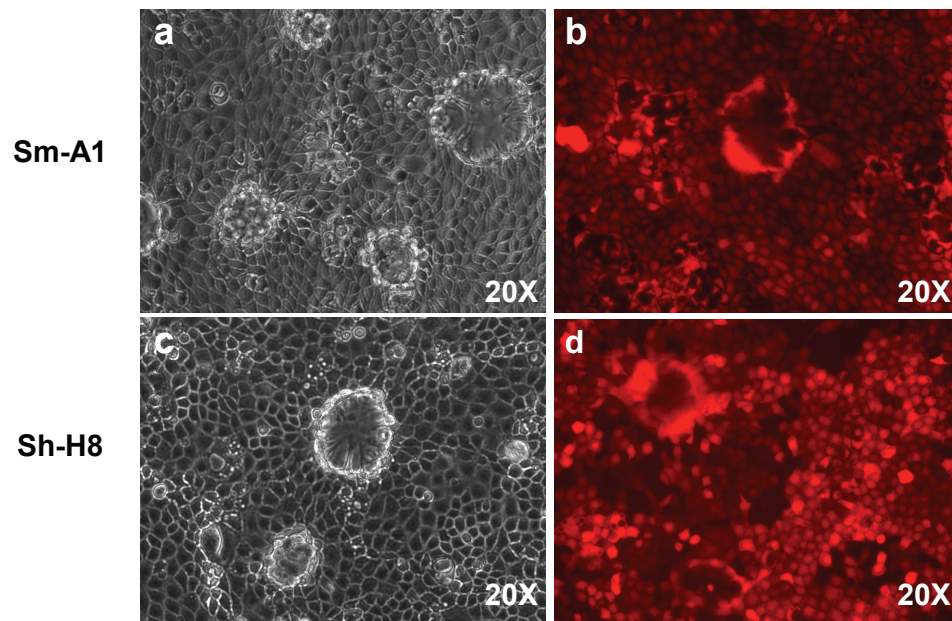
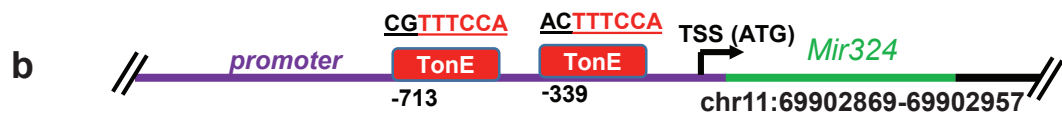
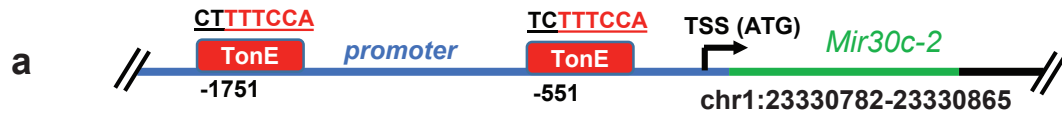


Fig. 8



Supplementary Fig. S1



TonE: TGGAAANNYY

Supplementary Fig. S2

3. Éléments supplémentaires de discussion

L'expression du MR a été identifiée dans les tissus épithéliaux où il joue rôle fondamental dans le contrôle de la balance hydrosodée et dans la régulation de la pression artérielle mais son expression a également été rapportée dans les tissus non épithéliaux où ils exercent d'autres fonctions. Une modification du niveau d'expression du MR et une altération de la signalisation relayée par le MR peuvent contribuer à l'apparition ou au développement de différentes pathologies comme le pseudohypoaldostéronisme de type I, l'insuffisance rénale avec la fibrose rénale, l'hypertension artérielle, ou encore le syndrome métabolique. Ces observations soulignent la nécessité de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de ce facteur de transcription, c'est pourquoi notre équipe s'est intéressée depuis de nombreuses années, à l'étude des mécanismes de régulation de l'expression MR dans le rein.

Mise en lumière d'un niveau supplémentaire de régulation de l'expression du MR

Durant les vingt-cinq dernières années, peu d'études s'étaient réellement intéressées aux mécanismes de régulation de l'expression du MR. Les travaux de notre équipe avaient d'abord permis de disséquer les mécanismes qui contrôlent la transcription du gène *NR3C2* codant le MR, avec notamment l'identification et la caractérisation fonctionnelle du promoteur proximal P1 et du promoteur distal P2 du gène *NR3C2* (Le Menuet et al., 2000; Munier et al., 2010; Zennaro et al., 1996). Plus tard, d'autres travaux ont étudié les modifications post-traductionnelles de la protéine MR (phosphorylation, sumoylation, ubiquitylation, acétylation), qui peuvent moduler l'activité et/ou la dégradation de la protéine MR et donc affecter son niveau d'expression (Pascual-Le Tallec et Lombès 2005; Faresse, 2012; S. Shibata 2013; Faresse 2014; Jiménez-Canino, Fernandes, et Alvarez de la Rosa 2016). Pourtant, ces deux niveaux de régulation ne permettaient pas d'expliquer comment les cellules rénales peuvent s'adapter aussi rapidement aux variations intenses de tonicité extracellulaire, qui prévalent dans le néphron. Nos travaux ont donc permis de mettre en lumière un niveau de régulation supplémentaire de l'expression du MR. En effet, ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle, impliquant le recrutement de miARNs capables de moduler la stabilité du transcrit MR, permet aux cellules rénales de s'adapter très rapidement au stress osmotique.

Rôle du facteur de transcription TonEBP/OREBP/NFAT5 dans la régulation de l'expression des miARNs

Dans cette première partie du chapitre Résultats - Discussions, nous avons pu montrer pour la première fois, que l'expression rénale du MR est régulée par l'hypertonie *via* le recrutement de miR-324-5p et de miR-30c-2-3p. Ces résultats nous ont donc interrogés sur le mécanisme par lequel l'hypertonie régule l'expression de ces miARNs.

Les précédents travaux de l'équipe avaient montré que l'expression de TonEBP (*Tonicity responsive Enhancer Binding Protein*), appelé aussi NFAT5 (*nuclear factor of activated T cells-5*) ou OREBP (*osmotic response element-binding protein*) est augmentée en réponse à l'hypertonie. Cette augmentation de l'expression de ce facteur de transcription, connu pour réguler l'expression des gènes impliqués dans l'adaptation au stress osmotique (Viengchareun et al., 2009), pourrait expliquer l'augmentation d'expression de miR-30c-2-3p et miR-324-5p en réponse à l'hypertonie. En effet, nous avons identifié des demi-sites de liaison TonE (*Tonicity responsive Elements*), qui sont localisés dans le promoteur des gènes *mir30c-2* ou du *mir324*, codant respectivement pour les miARNs miR-30c-2-3p et miR-324-5p. L'identification de ces demi-sites de liaison TonE suggère que TonEBP pourrait relayer l'effet de l'hypertonie sur la transcription des gènes codant ces deux miARNs, qui sont capables ensuite de réprimer l'expression du MR en se fixant sur la région 3'-UTR de ce transcrite. A noter que l'augmentation d'expression de ces deux miARNs en réponse à l'hypertonie est modeste (x1,5) alors que la diminution d'expression du MR est quasiment de 75 %. Ce résultat suggère que la régulation de l'expression du MR en réponse au stress osmotique fait appel non seulement à miR-30c-2-3p et miR-324-5p mais aussi à d'autres régulateurs post-transcriptionnels comme les protéines de liaison à l'ARN (Tis11b, HuR), que notre équipe avait identifiées et caractérisées fonctionnellement (Lema et al., 2017a, 2017b; Viengchareun et al., 2014).

De façon intéressante, l'implication des miARNs dans l'osmorégulation a été rapportée dans certaines espèces. Flynt et al ont par exemple identifié cinq membres de la famille miR-8, capables de réguler l'osmorégulation dans les embryons du poisson zèbre (Flynt et al., 2009). Les ionocytes, qui représentent un type de cellules spécialisées dispersées dans l'épiderme, sont responsables de l'homéostasie du pH et du transport d'ions au cours du développement précoce avant la formation des branchies. miR-8, qui fait partie d'une famille de miARNs hautement conservés, est exprimé dans les ionocytes et permet un contrôle précis du transport des ions en modulant l'expression de Nherf1, qui est un régulateur du trafic apical des transporteurs d'ions transmembranaires. Toute altération de l'expression d'un membre de la famille miR-8 entraîne une incapacité à répondre au stress osmotique

et bloque la capacité à transporter et/ou regrouper correctement les glycoprotéines transmembranaires à la surface apicale des ionocytes.

Les travaux de l'équipe de Yan *et al* ont par ailleurs montré que le miR-30c, un miARN fortement exprimé dans le rein, apparaît comme un osmorégulateur crucial chez le tilapia du Nil (Yan *et al.*, 2012a). La perte de fonction du miR-30c entraîne une incapacité à répondre au stress osmotique. La protéine Hsp 70 a été identifiée comme étant l'une des cibles directes du miR-30c. Ainsi, miR-30c régule directement Hsp 70 en ciblant sa région 3'-UTR, et l'inhibition de l'expression de miR-30c augmente substantiellement le niveau des transcrits Hsp 70 *in vivo*. A noter que la protéine Hsp 70 est connue pour être une des protéines chaperonnes interagissant avec le MR dans le compartiment cytoplasmique pour maintenir le récepteur dans une conformation propice à sa liaison avec l'aldostérone (Jaglaquier *et al.*, 1996), pour moduler l'affinité du MR pour son ligand (Huyet *et al.*, 2012), et pour protéger le MR de la dégradation par le protéasome (Faresse *et al.*, 2010). Ainsi, il serait tentant de penser qu'en plus de son action directe sur les transcrits MR et HuR, miR-30c-2-3p puisse également agir sur le transcrit Hsp 70, pour altérer la liaison du MR à son ligand et favoriser sa dégradation par le protéasome. Cependant, nous n'avons pas testé cette hypothèse dans ce travail.

Dans notre étude, nous avons suggéré que le facteur de transcription TonEBP/OREBP/NFAT5 pourrait moduler l'expression de miR-30c-2-3p et miR-324-5p. De façon intéressante, il existe aussi des études qui montrent que les miARNs peuvent également réguler l'expression de ce facteur de transcription, suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle. Le premier exemple vient des travaux de l'équipe de Yan *et al*, qui a identifié par des analyses bioinformatiques un site de liaison putatif pour miR-429 dans l'ARNm de l'OSTF1, un facteur de transcription impliqué dans l'osmorégulation dans l'épithélium branchial du tilapia du Nil. Ces auteurs ont montré que l'expression du miR-429 est diminuée chez le tilapia lors d'un stress osmotique, ce qui est cohérent avec l'augmentation d'expression de la protéine OSTF1 (Yan *et al.*, 2012b). miR-429 régule directement l'expression de l'OSTF1 en ciblant sa région 3'-UTR, et l'inhibition du miR-429 augmente d'un facteur 5 le niveau d'expression d'OSTF1. Le second exemple montre que miR-466a-3p est capable de cibler le transcrit *Nfat5* dans les cellules mIMCD3 (Y. Luo *et al.*, 2014). Dans un modèle de souris transgéniques surexprimant miR-466a-3p, une inhibition de l'expression *Nfat5* et de nombreux autres gènes liés à l'osmorégulation a été observée à la fois dans le cortex et la médulla rénale. L'ensemble de ces travaux montre que les miARNs participent à une boucle de rétrocontrôle en réponse au stress osmotique au niveau des organes osmorégulateurs dans différentes espèces et les résultats de notre étude apportent des arguments en faveur de cette boucle de rétrocontrôle chez les mammifères.

Récemment, une nouvelle étude de Kang et al a identifié miR-23a-5p comme étant un autre miARN, dont l'expression est modulée par les variations de tonicité (Kang et al., 2021). L'expression de ce miARN dans les cellules de la médullaire rénale interne est notamment réprimée en réponse à l'hypertonie. De façon remarquable, les auteurs ont montré que la diminution d'expression du miR-23a-5p facilite l'adaptation des cellules de la médullaire rénale au stress hypertonique par une augmentation de la survie cellulaire et de la prolifération cellulaire en modulant HSPA1B, une isoforme de la protéine de choc thermique Hsp 70. Cependant, nous n'avons pas identifié miR-23a-5p dont l'expression est réprimée en réponse de l'hypertonie. Peut-être parce que nous n'avons pas utilisé le même modèle cellulaire mais un modèle de cellules rénales distales dérivées du cortex, ni le même traitement que Kang et al. Dans notre étude, nous avons utilisé des approches de criblage (TLDA et miR-seq) en réponse à l'hypertonie induite par le raffinose et nous avons utilisé le modèle KC3AC1 de cellules principales du tubule collecteur cortical, qui exprime le MR de façon endogène. Dès lors, ces travaux nous invitent à étudier le mécanisme de régulation de l'expression du MR par les miARNs dont l'expression serait réprimée par l'hypertonie.

Dialogue croisé entre les protéines de liaison à l'ARN et les miARNs

Nous avons observé que miR-30c-2-3p et miR-324-5p et les protéines de liaison à l'ARN, Tis11b et HuR, agissent en réseau pour réguler la stabilité du transcrit MR. En effet, nos expériences de transfection transitoire du gène rapporteur de la luciférase dans les cellules HEK 293T, ont permis de montrer que Tis11b, en agissant de façon additive, avec chacun de ces miARNs peut diminuer l'activité luciférase dont l'ADNc a été cloné en amont de la région 3'-UTR du transcrit MR. Nous avons également montré que miR-30c-2-3p et miR-324-5p peuvent fonctionnellement interagir avec la région 3'-UTR du transcrit HuR. Plusieurs données de la littérature montrent en effet que les miARNs agissent en réseau et peuvent dialoguer avec les protéines de liaison à l'ARN (RBPs) (Bhattacharyya et al., 2006; Ciafrè and Galardi, 2013; Fukao et al., 2015; Ho et al., 2021; Ho and Marsden, 2014; Jens and Rajewsky, 2015; Jiang and Coller, 2012). Dans certaines situations, les RBPs sont même des cibles directes des miARNs et réciproquement, les RBPs peuvent également cibler des miARNs. Par exemple, il a été rapporté que le transcrit Tis11b est une cible directe de miR-29b dans le mécanisme de régulation de la stabilité du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Sinha et al., 2009) ou que miR-22 joue un rôle de suppresseur de tumeur en réprimant l'expression de HuR dans le cancer colorectal (Liu et al., 2018). A l'inverse, HuR peut également cibler le pre-miR-7, en se liant directement au dernier intron de *HNRNPK* qui contient le pré-miR-7, influençant ainsi la biogenèse de sa forme mature (Lebedeva et al., 2011; Srikantan et al., 2012). Dans d'autres situations, ces deux classes de régulateurs post-transcriptionnels peuvent agir de façon compétitive ou coopérative sur le même transcrit (Ciafrè and Galardi, 2013; Srikantan et al., 2012). Les RBPs peuvent ainsi renforcer l'effet des miARNs sur des ARNm cibles

communs et fonctionner comme des guides qui permettent l'ouverture de la structure de l'ARNm, permettant ainsi l'interaction entre les miARNs et leurs cibles peu accessibles. A l'inverse, les RBPs peuvent aussi contrecarrer l'action des miARNs en reconnaissant des sites de liaison qui se chevauchent ou qui sont très proches de la séquence "seed" des miARNs ou en modifiant des changements dans la structure secondaire de l'ARNm (Ciafrè and Galardi, 2013). Dans notre étude, bien que la position de la séquence «seed» du miR-324-5p ou du miR-30c-2-3p soit très proche de celle des éléments de réponse pour Tis11b (ARE 6, 7), nous n'avons pas trouvé de compétition, ni de synergie très remarquable entre Tis11b et l'un de ces deux miARNs. Leur effet sur la stabilité du transcrit MR est plutôt additive.

Les limites dans notre étude

Il existe des limites dans notre étude. Premièrement, nous avons identifié deux miARNs (miR-324-5p et miR-324-5p) dont l'expression est induite par l'hypertonie générée par le traitement par le raffinose, un tri-saccharide, qui ne pénètre pas dans les cellules, permettant ainsi d'augmenter la tonicité du milieu extracellulaire. Sachant que les variations de tonicité extracellulaire sont physiologiquement générées non seulement par le glucose, mais aussi par le sodium, le potassium et l'urée, il serait important de vérifier si l'expression de ces deux miARNs est également induite par le NaCl ou l'urée.

Deuxièmement, afin d'étudier la relevance physiologique des résultats que nous avons obtenus *in vitro*, nous avons traité des souris pendant 4 heures par du furosémide, un diurétique connu pour augmenter l'hypertonie luminale relative et pour diminuer l'expression du MR (Viengchareun et al., 2014). Ainsi, nous avons montré que l'expression de miR-324-5p et du miR-30c-2-3p est augmentée dans les reins de ces animaux respectivement d'un facteur 2 et 4. Cette augmentation d'expression de ces miARNs est supérieure à celle mesurée dans les cellules KC3AC1, suggérant que l'expression de ces miARNs est certainement augmentée dans les autres segments néphroniques. Il serait donc intéressant de quantifier l'expression de ces miARNs dans les segments néphroniques microdisséqués des souris traitées ou non par le furosémide ou de réaliser une analyse de l'expression de ces miARNs par RNAscope sur des coupes de rein. Nous pourrions ainsi préciser dans quels segments néphroniques ces deux miARNs sont exprimés et/ou régulés par l'hypertonie induite par le furosémide.

Enfin, nous avons montré par des expériences de transfection dans les cellules HEK 293T, que ces deux miARNs (miR-30c-2-3p et miR-324-5p) agissent en réseau avec les protéines de liaison à l'ARN (Tis11b, HuR) pour contrôler l'expression rénale du MR en réponse au stress hypertonique. Dans cette logique, nous avons cherché à savoir dans les cellules principales KC3AC1 si ces deux miARNs pouvaient coopérer ou agir de concert avec Tis11b pour potentialiser leur effet sur l'expression du MR.

Cependant, nous avons rencontré des difficultés techniques (efficacité de transfection et moment de la transfection) au cours de la transfection si bien que nous n'avons pas été en mesure de répondre à ces interrogations.

Conclusion et perspectives de cette partie

Malgré certaines limites à ce travail, cette 1^{ère} partie de mon travail de Thèse, qui repose sur un grand nombre de techniques (TLDA, miR-seq, RT-qPCR, Western Blot, transfection transitoire, génération d'une ligne stable de cellules rénale surexprimant du miR-324-5p par la stratégie lentivirale), a permis de mettre en lumière le rôle majeur de deux miARNs (miR-324-5p et miR-30c-2-3p) dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR en réponse au stress hypertonique. Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux de notre groupe, qui avait étudié l'impact des variations de tonicité extracellulaire sur l'expression rénale du MR. Nos résultats ont montré que ces deux miARNs affectent directement la stabilité du transcrit MR ou l'expression du MR en ciblant le transcrit HuR en réponse à l'hypertonie. Ces miARNs peuvent de plus agir de concert avec Tis11b pour potentialiser l'effet de l'hypertonie sur l'expression du MR. Enfin, nous avons montré que cette altération de l'expression du MR a un impact sur l'expression des gènes cibles précoces du MR, qui régulent la réabsorption de sodium.

En perspective de ce travail, il serait également intéressant d'identifier les miARNs, dont l'expression serait modulée par l'hypotonie. Enfin, notre groupe a récemment identifié une fenêtre temporelle restreinte au cours du développement rénal où la signalisation du MR est inefficace en raison d'une faible expression du MR durant la période périnatale. Cette baisse d'expression du MR est tissu-spécifique puisque l'expression du MR est constante dans le poumon, qui est un autre tissu cible épithélial du MR. Dans ce contexte, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle, miR-324-5p et miR-30c-2-3p et/ou les protéines de liaison à l'ARN, Tis11b et HuR, pourraient être responsables de cette baisse d'expression du MR à la naissance. C'est pourquoi, nous avons cherché à évaluer si de tels mécanismes de régulation post-transcriptionnelle étaient impliqués dans la régulation de l'expression du MR durant la période périnatale.

Partie 2 : Rôle des miARNs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du récepteur minéralocorticoïde durant la période périnatale

1. Justification du projet

1.1. Contexte de l'étude

Au cours de la première semaine de vie, le nouveau-né perd de 5 à 10% de son poids corporel en lien avec une perte urinaire d'eau et de sel (Sulemanji and Vakili, 2013). Il s'agit d'un phénomène physiologique et courant chez les nouveau-nés à terme. En effet, avant la naissance, l'eau représente environ 90 % du poids corporels chez un fœtus de 24 semaines (Bizzarri et al., 2016) et l'équilibre des nutriments, des solutés et de l'eau dans le liquide amniotique tout au long de la gestation assure l'homéostasie avec une concentration stable d'électrolytes chez le fœtus. A la naissance, contrairement à l'adulte, le nouveau-né possède une masse hydrique importante qui représente environ 80% du poids corporel total (Sulemanji and Vakili, 2013). Ensuite, après la naissance, une redistribution des fluides corporels se produit avec notamment l'élimination de l'excès de sodium et d'eau par les reins. Ces changements physiologiques de la redistribution de l'eau et des solutés dans l'organisme après la naissance sont essentiels pour assurer une transition en douceur de l'environnement aquatique intra-utérin à la vie extra-utérine.

Pourtant, cette perte urinaire d'eau et de sel est majorée et dure plus longtemps dans certains contextes pathologiques, et en premier lieu, en cas de prématurité (Segar, 2020; Sulemanji and Vakili, 2013; Zhang and Zeng, 2020). Une mauvaise prise en charge de ces nouveau-nés fragiles pourrait avoir des conséquences importantes. Au niveau mondial, le taux des naissances prématurées était de 10,6% en 2014, ce qui équivaut à une estimation de près de 15 millions de naissance dans le monde (Chawanpaiboon et al., 2019; Walani, 2020). Ce chiffre varie entre les pays. En France, la prévalence de la prématurité a été évaluée en 2016 à environ 7,5 % des naissances, ce qui représente approximativement 60 000 nouveau-nés prématurés par an (Blondel et al., 2017; Sentilhes et al., 2016). Ces nouveau-nés présentent à la naissance une tubulopathie avec des capacités de concentration des urines restreintes et une perte accrue de sodium (Gubhaju et al., 2014). Par ailleurs, la fonction rénale chez le nouveau-né prématuré n'est pas seulement immature à la naissance, il y a aussi un retard significatif dans l'atteinte de la pleine capacité de la fonction rénale.

En dehors de l'immaturité de la peau qui est aussi une des causes de la perte d'eau, le rein joue un rôle indispensable dans ce changement de l'homéostasie de l'eau et des électrolytes pendant cette période post-natale. Les reins néonataux présentent un faible taux de filtration glomérulaire et une immaturité

du néphron distal, ce qui entraîne une capacité réduite à concentrer l'urine (Bizzarri et al., 2016). L'aldostérone est essentielle à la rétention du sodium dans le rein, les glandes salivaires, les glandes sudoripares et le côlon. Récemment, les travaux du Dr Laetitia Martinerie, qui travaille dans notre équipe, ont montré que le taux d'aldostérone plasmatique mesuré dans le sang de cordon de 48 nouveau-nés à terme était plus élevé chez les nouveau-nés que chez leur mère (Martinerie et al., 2009a). La résistance partielle et transitoire à l'aldostérone ainsi observée chez ces nouveau-nés pouvait être expliquée par l'expression rénale du MR au cours de l'ontogenèse rénale. Ainsi, les travaux de l'équipe ont montré que cette expression rénale du MR (transcrit et protéine) est très faible à la naissance à la fois chez la souris mais aussi chez l'homme, après une expression transitoire de son ARNm entre le 16^e et le 18^e jour de gestation chez la souris, et la 15^{ème} et 24^{ème} semaine d'aménorrhée (SA) chez la femme (Martinerie et al., 2009b). L'expression rénale du MR augmente ensuite en période post-natale à 8 jours de vie chez la souris et durant les premiers mois de vie chez l'homme. Ce profil d'expression biphasique de l'expression du MR a été aussi retrouvée au niveau du cœur et du cerveau, deux autres organes cibles du MR. Au contraire, l'expression de MR est maintenue au cours de la période périnatale, dans le poumon, qui est également un tissu cible du MR, permettant la résorption du liquide pulmonaire à la naissance (Martinerie et al., 2013).

Il est important de souligner que cette diminution de l'expression rénale du MR en période périnatale persiste chez les nouveau-nés prématurés (Dumeige et al., 2020), conduisant à une perte majeure de sel et d'eau chez ces sujets fragiles. En revanche, la surcharge d'eau et de sel dans la prévention de la déshydratation et celle d'une perte de sodium excessive sont associées à une morbi-mortalité accrue dans cette population. Par ailleurs, les prématurés courent un risque plus élevé de développer plus tard dans leur vie l'hypertension artérielle (Chatmethakul and Roghair, 2019; Dumeige et al., 2020; Parkinson et al., 2013). L'ensemble de ces données suggère donc qu'il est essentiel de comprendre les mécanismes de régulation, qui contrôlent de manière temps- et tissu-spécifique l'expression du MR afin de proposer une meilleure prise en charge de ces nouveau-nés prématurés et de prévenir l'émergence, à l'âge adulte, de l'hypertension artérielle. Cependant, les mécanismes responsables de cette baisse d'expression du MR durant la période périnatale demeurent méconnus à ce jour.

1.2. Hypothèse de travail

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que les mécanismes de régulation, que nous avons décrits dans la 1^{ère} partie de ce chapitre Résultats, et qui impliquent le recrutement de miARNs pourraient être impliqués dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR durant la période périnatale où les variations de tonicité sont induites par les modifications de l'environnement lors du passage de la vie aquatique intra-amniotique à la vie extra-utérine.

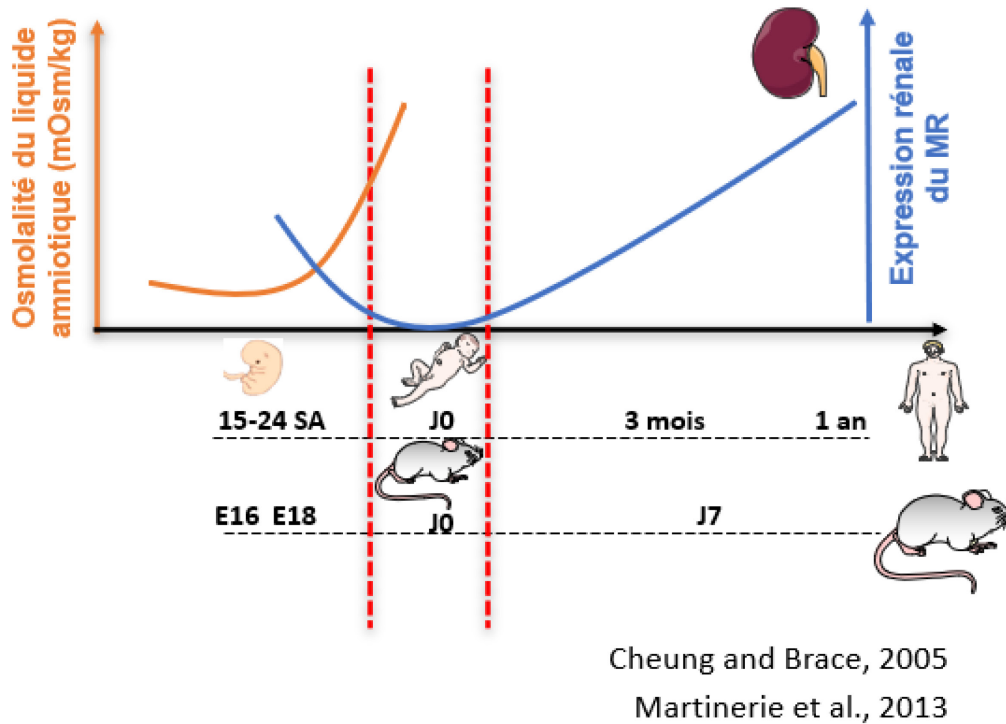


Figure 20 : Lien entre l'expression rénale du MR et les variations d'osmolalité du liquide amniotique durant la période périnatale

En effet, il a été montré que l'osmolalité du liquide amniotique est stable pendant la gestation (entre le jour 11,5 et le jour 16,5 chez les rongeurs) puis elle augmente brusquement de E18 à l'accouchement (Cheung and Brace, 2005). De façon intéressante, cette augmentation de l'osmolalité coïncide avec la diminution parallèle de l'expression rénale du MR (Martinerie et al., 2009b) (**Figure 20**).

1.3. Objectifs du travail

Dans cette 2^e partie du Chapitre Résultats, nous avons pour objectifs :

- 1) d'analyser l'expression de miR-324-5p et miR-30c-2-3p aux différents stades du développement rénale (E18,5, J0 et J8) chez la souris.
- 2) d'étudier l'impact de la modulation de l'expression de ces miARNs candidats sur l'expression du MR dans des cultures primaires de cellules rénales de souris sacrifiées à J0 et J8 de vie.

A J0, l'expression du MR est faible. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces deux miARNs pourraient réprimer l'expression du MR, c'est pourquoi, nous avons choisi de transfecter dans les cellules rénales isolées de souriceaux sacrifiés à J0 de vie, des « Inhibiteurs » de miR-324-5p et miR-30c-2-3p (Life Technologies), qui sont des petites molécules exogènes, permettant de bloquer spécifiquement l'action de ces miARNs.

A J8, l'expression rénale du MR est plus augmentée. Nous avons donc cherché à transfecter les cellules rénales isolées de souriceaux sacrifiés à J8, avec des molécules « Mimics exogènes » de miR-324-5p et miR-30c-2-3p (Life Technologies), permettant de surexprimer spécifiquement ces deux miARNs.

2. Résultats

Les résultats de cette seconde partie de ce chapitre sont présentés sous la forme d'un manuscrit en préparation, qui s'inscrit dans le cadre du projet ANR JCJC PERIMIRE (ANR-20-CE14-0015, PI : Dr Laetitia Martinerie), qui vise à étudier le rôle des protéines de liaison à l'ARN (Tis11b et HuR) et des miARNs dans le contrôle de l'expression rénale du MR. Dans ce projet ANR, j'ai pu mettre en place toutes les techniques d'analyse et de quantification des miARNs (extraction, quantification, transfection, RT-qPCR) et j'ai également encadré à la paillasse deux étudiantes Master 2 de l'Université Paris-Saclay (Laura Atger-Lallier et Imène Hani). Ce travail sera poursuivi par Imène Hani, qui vient d'obtenir une bourse de thèse MESRI (2021-2024), qui lui permettra de poursuivre et de finaliser ce projet PERIMIRE.

Article 2

**Involvement of miR-324-5p and miR-30c-2-3p in the Post-Transcriptional
Control of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression
During the Perinatal Period**

Imene Hani, **Thi An Vu**, Julie Perrot, Laura Atger-Lallier, Eric Pussard, Pascal Boileau,
Peter Kamenický, Marc Lombès, Say Viengchareun*, Laetitia Martinerie*

* Ces auteurs ont contribué de façon équivalente

(Article en préparation)

Involvement of miR-324-5p and miR-30c-2-3p in the Post-Transcriptional Control of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression During the Perinatal Period

Imene Hani¹, Thi An Vu¹, Julie Perrot¹, Laura Atger-Lallier¹, Eric Pussard^{1,4}, Pascal Boileau^{1,5}, Peter Kamenický^{1,6}, Marc Lombès¹, Say Viengchareun^{*1}, Laetitia Martinerie^{*1,2,3}.

* Contributed equally

¹Université Paris-Saclay, Inserm, Physiologie et Physiopathologie Endocriniennes, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France ;

²Université de Paris, 75006, Paris, France ;

³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debré, Service d'Endocrinologie et de Diabétologie Pédiatrique, 75019, Paris, France;

⁴Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital de Bicêtre, 94275, Le Kremlin Bicêtre, France ;

⁵ Department of Neonatal Pediatrics, Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy-Saint-Germain, 10, Rue du Champ Gaillard 78300 Poissy France ; Université Paris-Saclay, UVSQ, 78180, Montigny-Le-Bretonneux, France ;

⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, 94275, Le Kremlin Bicêtre, France.

Correspondence should be addressed to:

Say Viengchareun, PhD

Inserm U1185, Faculté de Médecine Paris-Saclay
63 rue Gabriel Péri, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

E-mail : say.viengchareun@universite-paris-saclay.fr

Tel: 33 1 49 59 67 15

Fax: 33 1 49 59 67 32

Or

Laetitia Martinerie, MD, PhD

Service d'Endocrinologie et de Diabétologie Pédiatrique
Hôpital Robert Debré

49 boulevard Sérurier, 75019 Paris

E-mail : laetitia.martinerie@aphp.fr

Tel: 33 1 49 59 67 02

Fax: 33 1 49 59 67 32

Introduction

During the first week of life, newborns are losing up to 10% of their body weight (BW) together with an increased urinary fluid and sodium loss (Sulemanji and Vakili, 2013). This is a physiological and common issue in term newborns. Indeed, before birth, water accounts for about 90% of BW in a 24-week-old fetus (Bizzarri et al., 2016) and the balance of nutrients, solutes, and water in the amniotic fluid throughout gestation ensures homeostasis with a stable electrolyte concentration in the fetus. At birth, unlike the adult, the neonate has a large water mass that accounts for about 80% of total BW (Sulemanji and Vakili, 2013). Then, after birth, a redistribution of body fluids occurs, including the elimination of excess sodium and water by the kidneys. These physiological changes in body water and solutes after birth is essential for an appropriate transition from the intra-uterine aquatic environment to extra-uterine life.

However, this urinary water and salt loss is exacerbated and lasts longer in certain pathological contexts, notably in prematurity (Segar, 2020; Sulemanji and Vakili, 2013; Zhang and Zeng, 2020). Poor management of these fragile newborns could have significant consequences. Indeed, 25% of preterm neonates present with an episode of hyponatremia (< 130 mmol/L) during their neonatal care (Baraton et al., 2009). The clinical consequences of inadequate compensation of salt loss may have major impact on renal and neurological development, impairing most notably postnatal growth (Haycock, 1993). The preterm birth rate in the world was estimated at 10.6% in 2014, which corresponds to approximately nearly 15 million births worldwide (Chawanpaiboon et al., 2019; Walani, 2020). This value greatly varies among different countries. The prevalence of prematurity in France was estimated approximately to 7.5% of births in 2016, which may represent up to 60,000 preterm newborns/year (Blondel et al., 2017; Sentilhes et al., 2016). These neonates are born with tubulopathy and with restricted urine concentrating abilities and increased sodium loss (Gubhaju et al., 2014). In addition, renal function in preterm neonates is not only immature at birth, but there is also a significant delay in achieving full capacity of renal function.

Renal mineralocorticoid signaling is involved in sodium reabsorption in the aldosterone-sensitive distal nephron. This signaling pathway is tightly regulated by aldosterone, a steroid hormone secreted by the adrenal glands, which binds to and activates the mineralocorticoid receptor (MR), which belongs to the nuclear receptor family, and which acts as a ligand-activated transcription factor (Viengchareun et al., 2007). Upon ligand-binding, MR translocates to the nucleus, and after dimerization, binds to DNA onto mineralocorticoid response elements, to allow the transcription of target genes. Most of them are involved in the reabsorption of sodium in the distal tubule, including the α -subunit of the *epithelial sodium channel* (α ENaC), the *Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1* (*Sgk1*) and the

Glucocorticoid-induced leucine zipper (GIlz). Cortisol may also bind to the MR and active the mineralocorticoid signaling pathway. However, the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2) enzyme ensures MR selectivity in epithelial cells of the aldosterone sensitive distal nephron by metabolizing cortisol into cortisone, an inactive compound, which does not bind to MR.

Few information is available regarding regulatory mechanisms that control MR expression. Previous studies from our group demonstrated that transcription of the human *NR3C2* gene, which encodes for the MR, is under the control of two alternative promoters (Le Menuet et al., 2000; Munier et al., 2010; Zennaro et al., 1996). Later, we and others showed that post-translational modifications of the MR protein (phosphorylation, sumoylation, ubiquitylation, acetylation) can modulate the activity and the half-life of MR (Faresse, 2014; Faresse et al., 2012; Pascual-Le Tallec and Lombès, 2005; Shibata et al., 2013). Finally, we demonstrated that variations in extracellular tonicity, that prevail in the nephron, modulate MR expression (Viengchareun et al., 2009). The underlying molecular mechanisms involve post-transcriptional regulatory mechanisms including most notably the recruitment of RNA-binding proteins (RBP). Indeed, our team demonstrated that hypertonicity alters mineralocorticoid signaling by recruiting the RNA-binding protein Tis11b (Tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11b), which accelerates MR transcript degradation (Viengchareun et al., 2014). Conversely, hypotonicity recruits the RNA-binding protein HuR (Human antigen R), which by binding to the 3'-UTR (UnTranslated Region) of the MR transcript, promotes splicing of the full-length form of the MR transcript (Lema et al., 2017b) and stabilizes the MR transcript by binding to its 3'-UTR region (Lema et al., 2017a), thereby enhancing mineralocorticoid signaling. Recently, we also showed that hypertonicity inhibits renal MR expression by recruiting miRNAs, which represent another class of post-transcriptional regulators. Using high-throughput Taqman Low Density Array and miRNA-Sequencing approaches, we identified miR-30c-2-3p and miR-324-5p, expression of which is increased under hypertonicity. Functional studies demonstrated that miR-324-5p and miR-30c-2-3p directly affect the stability of MR transcripts and act in concert with Tis11b to destabilize MR and HuR transcripts (Vu et al., 2021, *in revision*). Overexpression of these miRNAs (with lentivirus or Mimics) in renal KC3AC1 renal cells decreases MR expression and alters mineralocorticoid signaling.

Beside physiological weight loss after birth due to sodium and water urinary losses (Martinerie et al., 2009b), our group have showed that plasma aldosterone levels, measured in the cord blood of 48 full-term neonates, were higher in the neonates than in their mothers (Martinerie et al., 2009a). This partial and transient resistance to aldosterone observed in these neonates could be explained at least in part by the low renal MR expression during renal ontogeny, notably at birth. Indeed, we have showed that renal MR expression (transcript and protein levels) is very low at birth both in mice and humans, after a transient expression of its mRNA between the 16th and 18th day of gestation in mice,

and the 15th and 24th week of amenorrhea in women (Martinerie et al., 2009b). Renal MR expression then increases postnatally at 8 days of life in mice and during the first months of life in humans. This biphasic pattern of MR expression was also observed in the heart and brain, two other target tissues of MR. In contrast, MR expression is maintained during the perinatal period in the lung, which is also a target tissue, allowing the resorption of pulmonary fluid at birth (Martinerie et al., 2013). It is important to note that this decrease in renal expression of MR in the perinatal period persists in premature newborns (Dumeige et al., 2020; Martinerie et al., 2015), leading to a major salt and water losses in these fragile subjects. In addition, premature infants have a higher risk of developing metabolic syndrome and high blood pressure later in life (Chatmethakul and Roghair, 2019; Parkinson et al., 2013). Altogether, these data suggest that it is pivotal to understand the regulatory mechanisms that control renal expression of the MR in a time- and tissue-specific manner to propose a better management of these premature newborns and to prevent the emergence, in adulthood, of long-term deleterious consequences. However, mechanisms responsible for this decrease in MR expression during the perinatal period remain unknown to date.

In this study, we hypothesized that miR-324-5p and miR-30c-2-3p might be involved in the post-transcriptional control of renal MR expression during the perinatal period where tonicity variations are induced by environmental changes during the transition from intra-amniotic aquatic life to extra-uterine life. Therefore, we modulated expression levels of these miRNAs with specific Inhibitors or Mimics that we transfected in primary cultures of kidney cells, isolated from kidneys of newborn mice, sacrificed on the day of birth (D0) or at D8 postnatally, and evaluated the impact on MR expression.

Materials and Methods

Animal model and tissue collection

To study renal MR and miRNAs expression at different developmental stages during the perinatal period, we used Swiss mouse model (Janvier laboratories, Le Genest-Saint-Isle, France). We chose pregnant Swiss CD-1 mouse for the ease of managing their reproduction, for their large litter size and especially for their short duration management (about 19-20 days). Two pregnant mice at 12.5 day of gestation (E12.5) were ordered from Janvier laboratory. An acclimatization period of one week was done before any experiment. Mice were bred according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The animal facility was granted approval (no. C94-043-12) by the Ministry of Agriculture, France. The whole project was approved by the CEEA CAPSUD n°26 (APAFIS number n° 20058/2019021822132339). A caesarean section was then performed in a pregnant female at E18.5 to extract the fetuses. These fetuses were euthanized by cervical dislocation in order to recover their kidneys. Another female gave birth the next day. Half of the mice were sacrificed by decapitation at D0, and the other half at D8. For each sacrificed animal, both kidneys were collected either for transcript expression analysis (mRNAs and miRNAs) by RT-qPCR or for primary kidney cell cultures (**Figure 1**).

Primary cultures of kidney cells

To study the impact of modulation of miRNA expression on MR expression, we used a model, already established in our laboratory, of primary cultures of kidney cells isolated from mice sacrificed at birth (D0) or at D8 postnatally (Dumeige et al., 2020). Once collected from mice sacrificed at D0 or D8, kidneys were placed in a 1.5 mL Eppendorf® tube containing 1X PBS. Whole kidneys were then digested in 1X Accutase solution (Sigma): 150 µL/tube (mice born at D0) or 300 µL/tube (mice born at D8) at 37°C for 30 min or 60 min, respectively. Then, kidneys were transferred to a sterile Petri dish and finely dilacerated with a sterile scalpel in the presence of 1 mL of complete epithelial cell culture medium composed of DMEM/HAM'S F12 without glutamine, supplemented with 20 mM HEPES (Life Technologies), 5 µg/mL insulin (Sigma), 5 µg/mL transferrin (Life Technologies), 100 IU/mL penicillin (Life Technologies), 100 µg/mL streptomycin (Life Technologies), 2 mM glutamine (Life Technologies), 50 nM dexamethasone (Sigma), 2 nM triiodothyronine T3 (Sigma), 50 nM sodium selenite (Sigma), 10 ng/mL EGF (Epidermal Growth Factor, Tebu), and 5% dextran-coated charcoal fetal calf serum (Biowest), and 1% Fungizone (Life Technologies). Most of reagents were from Life technologies, France, unless otherwise stated. The dilacerated fragments were gently transferred to a tube containing 12 mL of complete medium. After centrifugation for 3 min at 400xg, the supernatant was

removed, and the cellular pellet was resuspended in 12 mL of complete medium. Cell suspension was thereafter distributed at a rate of 1 mL of cell suspension per well, in a 12-well-plate, previously coated with a thin layer of rat tail collagen at 2 mg/mL (Institut Jacques Boy, France). Note that 2 mouse kidneys collected at D0 were required to seed a 12-well-plate whereas half a kidney collected at D8 was needed to seed a 12-well-plate. Cells were then incubated at 37°C in a saturated atmosphere with 5% CO₂.

Immunocytochemistry

Primary kidney cells were cultured on 4-well culture chambers (Lab-Tek, Sartedt). On day 6 of culture, cells were washed in 1X PBS then fixed for 1 h with 4 % paraformaldehyde (Electron Microscope Sciences). Cells were analyzed by immunocytochemistry using a goat Alexa 555-coupled secondary antibody raised against the rabbit MR antibody (39N, developed by our lab) (Viengchareun et al., 2009). Cells were observed with the Olympus BX 61 and images were acquired at 40x magnification using a Retiga-2000R monochrome camera (Q Imaging).

Transfection of specific Inhibitors or Mimics

At Day 4 after seeding, when primary kidney cells have reached approximately 60-70% confluency, exogenous miRNAs (Life Technologies), including miR-324-5p Inhibitor (100 nM), miR-30c-2-3p Inhibitor (10 nM) and Negative Control Inhibitor (CTR Inhibitor) were transfected with Lipofectamine RNAimax reagent (Life Technologies) into primary kidney cells obtained from kidneys isolated at D0. Conversely, Mimics for miR-324-5p (100 nM), miR-30c-2-3p (10 nM) and for Negative Control (Mimic CTR) were transfected with Lipofectamine RNAimax reagent (Life Technologies) into primary kidney cells obtained from kidneys isolated at D8. References for Inhibitor and Mimic molecules are listed in **Supplemental Table 1**. To get access to the functional consequences of these modulations on MR expression, total RNAs and protein extracts were extracted and processed for RT-qPCR and Western blot analysis after 24 h and 48 h, respectively.

Total RNAs isolation

Total RNAs including messenger RNAs and miRNAs were extracted from kidneys of mice (D0 and D8) and fetuses (E18.5) or from primary cultures of kidney cells isolated from mice sacrificed at D0 and D8 using the NucleoSpin miRNA isolation kit (Macherey-Nagel) and according to the manufacturer's procedure.

RT-qPCR for mRNAs

One microgram of total RNAs was treated with DNase I (Biolabs) then RNAs were reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies). Samples were analyzed by RT-qPCR using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) with the primers indicated in **Supplemental Table 2** and run on QS6 Real-Time PCR System (Life Technologies). The specificity of each primer set was confirmed by cloning each amplicon into the pGEMT-easy plasmid (Promega) and sequencing. Efficiency of qPCR was controlled before analysis. Relative expression in each sample was calculated as a ratio (amoles of specific gene/fmoles of 18S or amoles of 36b4), where the control condition values are arbitrarily set at 100% for kidney samples from mice sacrificed at D0 or set at 100% for experiences in primary cultures of kidney cells.

RT-qPCR for miRNAs

Multiplex reverse-transcription and quantitative PCR were performed as previously described (Vu et al., 2021 in revision). List of specific miRNA stem-loop primers and TaqMan probes are presented in **Supplemental Table 3**. The specificity of each miRNA TaqMan probe was confirmed by cloning each amplicon into the pGEMT-easy plasmid (Promega) and sequencing. Efficiency of qPCR was controlled before analysis. Relative expression level of each miRNA was normalized to the housekeeping mmu-miR-16. Results represent relative expression normalized to that obtained in kidney samples from control mice sacrificed at D0, which were arbitrarily set at 100% or in control condition, which were also arbitrarily set at 100%.

Protein isolation and Western Blot analysis

Total protein was extracted from 12-well plates of primary cultures of kidney cells were lysed with 100 µL of lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 30 mM sodium pyrophosphate; 50 mM sodium fluoride; 1% Triton X100 and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma). The debris were removed by centrifugation at 15 000g in 20 min. Protein concentrations were determined by the BC Assay (Interchim). Thirty micrograms of protein extracts were denatured at 95°C for 5 min in 4X Laemmli buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, 0.2% Bromophenol Blue), then subjected to SDS-PAGE and processed for detection of MR with α-tubulin protein as a loading control. Detailed information about the antibodies used is provided in **Supplemental table 4**. Detection and quantification of specific fluorescent signals were performed with an Odyssey Fc (Li-Cor, Lincoln, NE, USA).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using non-parametric Mann-Whitney *U*-tests to compare two parameters and using ANOVA Kruskal-Wallis test to compare three or more parameters followed by a post-test of Dunn when appropriate (GraphPad Prism 6, GraphPad software, San Diego, USA). Correlation between two parameters was obtained by Spearman regression analysis with significant threshold set at 0.05.

Results

Expression of (*Nr3c2*) MR, miR-324-5p, miR-30c-2-3p during the perinatal period

To confirm our working hypotheses, we measured by RT-qPCR the expression of MR, miR-324-5p and miR-30c-2-3 in kidney samples collected at different developmental stages (E18.5; D0; D8) from Swiss mice. Kidney sampling program at different stages of development is presented in **Figure 1**. Given the difficulties to collect human kidney samples from fetus and newborns, the pregnant Swiss CD-1 mouse model, that we have chosen, constitutes a good and reliable alternative strategy to study mineralocorticoid signaling during the perinatal period. Swiss CD-1 mice have the reproduction easy to manage many offsprings and have also a short gestation period (about 19-20 days). Moreover, our group has already demonstrated a conserved ontogeny of renal mineralocorticoid signaling pathways between mice and humans (Martinerie et al., 2013). **Figure 2** illustrates RT-qPCR analyses of *Nr3c2* (MR), miR-324-5p, and miR-30c-2-3p expression in the kidneys of mice sacrificed at E18.5, D0 and D8. Expression levels were compared to that measured at D0 since previous work from our team demonstrated that MR expression is biphasic with a decrease of MR expression at birth and an increase postnatally to facilitate sodium reabsorption (Martinerie et al., 2009b). **Figure 2A** indicates that no significant difference in *Nr3c2* (MR) expression was observed between E18.5 and D0. In contrast, and as expected, *Nr3c2* (MR) expression increased by 4.3-fold between D0 and D8 ($P < 0.0001$). However, these latter results, which were obtained with Swiss mice, contrast with those previously obtained by our group, in which MR expression was shown to decrease between E18.5 and D0 in B6D2-F1 mice. Renal expression of miR-324-5p was variable during the different stages of development with a drastic 54% decrease in its expression at D8 ($P < 0.0001$). No difference in its expression was found between E18.5 and D0 (**Figure 2B**). Similarly, a significant 36% decrease in miR-30c-2-3p expression was observed at D8 ($P = 0.0019$) (**Figure 2C**). This expression pattern with a decrease at D8 is in accordance with our working hypotheses since the increase of *NR3C2* (MR) transcripts between D0 and D8 could be due to the destabilizing action of these repressing miR-324-5p and miR-30c-2-3p whose expression decreases in parallel. Indeed, a negative correlation exists between the expression of miR-324-5p (**Figure 2D**; $P_{\text{Spearman}} < 0.0001$) or miR-30c-2-3p (**Figure 2E**; $P_{\text{Spearman}} = 0.0078$) and that of *Nr3c2* (MR). These results support a functional role for these two miRNAs in the posttranscriptional regulation of MR during this developmental period.

MR expression in primary culture of kidney cells isolated from D0 and D8 newborn mice

Figure 3A shows the morphology of primary cultures of kidney cells isolated from a mouse sacrificed at D0 (upper panel) or at D8 (lower panel). Microphotographs were taken at Day 0, Day 2 and Day 6 following seeding. Interestingly, tubular fragments begin to adhere to the bottom of the culture plate. Two days after seeding, epithelial cells began to migrate from these tubular fragments. On the 6th day of culture, we could observe a confluent monolayer of kidney cells with a characteristic morphology of differentiated epithelial cells, including the formation of domes, which suggests a hydro-electrolytic transport might occur. However, on the 6th day of culture, kidney cells isolated from D0 mice presented with islets of epithelial cells which did not form any dome. Immunodetection of MR protein, performed in these cells at Day 6 of culture, revealed that kidney cells, isolated from a mouse sacrificed at D0 (**Figure 3B**), do not express MR (left panel) whereas those isolated from a mouse sacrificed at D8 express MR protein (right panel). Therefore, these results allow to validate this experimental model since MR expression in these primary cultures of kidney cells is comparable to the situation observed *in vivo*.

Inhibition of miRNA expression in primary culture of kidney cells isolated from D0 mice

We then aimed at modulating miR-324-5p and miR-30c-2-3p expression in primary cultures of renal cells to assess the impact on endogenous MR expression. Since renal MR expression at D0 is very low, we sought to prevent action of endogenous miR-30c-2-3p and miR-324-5p, which act as negative regulators, by transfecting specific miRNA inhibitors for these miRNAs (Life Technologies). After quantifying expression of these miRNAs, we analyzed *Nr3c2* (MR) expression by RT-qPCR (**Figure 4**) and by western blot (**Figure 5**). **Figure 4A** shows that transfection of 30c-2-3p inhibitors completely inhibited miR-30c-2-3p expression (***, $P=0.0002$) compared to CTR Inhibitor condition. We obtained comparable results with 324-5p inhibitors, which also inhibited miR-324-5p expression (****, $P<0.0001$) compared with the CTR Inhibitor condition (**Figure 4C**). However, silencing expression of these two miRNAs did not significantly alter the level of *Nr3c2* (MR) transcripts (**Figure 4B** and **4D**), suggesting that miR-30c-2-3p and miR-324-5p may not be involved in the regulation of renal MR expression at birth. **Figure 5A** and **Figure 5B** show analyses of MR expression in these primary cultures of kidney cells transfected with miR-30c-2-3p or miR-324-5p inhibitors. Normalized MR expression did not vary regardless of the transfected miRNA inhibitor. However, a trend towards increased MR was observed in the presence of the 324-5p inhibitor (**Figure 5B**)

Overexpression of miRNA expression in primary culture of kidney cells isolated from D8 mice.

Primary cultures of renal cells, isolated from kidneys of mice sacrificed at D8, express MR (see **Figure 3C**, right panel). To determine whether endogenous miRNAs (miR-30c-2-3p and miR-324-5p)

may be involved in the post-transcriptional control of MR expression at D8, we sought to overexpress these miRNAs by transfecting specific Mimics (Life Technologies). Expression of each miRNA was thereafter analyzed by RT-qPCR, then the expression of *Nr3c2* (MR) transcripts was analyzed by RT-qPCR and that of the MR protein by western blot. Transfection of Mimics 30c-2-3p (**Figure 6A**) increased miR-30c-2-3p expression by nearly 400-fold compared to the control condition (****, $P < 0.0001$), allowing analysis of *Nr3c2* (MR) transcript expression, which decreased by 30% compared with the control condition (**, $P = 0.0013$), suggesting that miR-30c-2-3p participates to the modulation of renal MR expression in the postnatal period (**Figure 6B**). Although transfection of Mimics 324-5p (**Figure 6C**) increased miR-324-5p expression by nearly 5000-fold compared to the control condition (***, $P = 0.0001$), we did not observe any impact on *Nr3c2* (MR) expression (**Figure 6D**), suggesting that miR-324-5p is not involved in the control of renal MR expression in this postnatal period.

To validate these results at MR protein level, we performed western blot experiments. **Figure 7A** and **Figure 7B** show the protein expression of the MR in kidney cells transfected with Mimics 30c-2-3p and Mimics 324-5p. These western blot results did not show any significant variation in MR expression regardless of the Mimic transfected, but there appeared to be a trend towards decreased MR expression in the presence of increased miR-30c-2-3p expression (**Figure 7A**).

Figure legends

Figure 1: Kidney sampling program at different stages of development

Two pregnant Swiss CD1 mice at E12.5 were ordered from Janvier Lab (France). An acclimatization time of one week was done before any experiment. The whole project was approved by the CEEA CAPSUD n°26 (APAFIS number n° 20058/2019021822132339). A caesarean section was then performed in a pregnant female at E18.5 to extract the fetuses. These fetuses were euthanized by cervical dislocation to recover their kidneys. Another female gave birth the next day. Half of the mice were sacrificed by decapitation at D0, and the other half at D8. For each sacrificed animal, both kidneys were collected either for transcript expression analysis (mRNAs and miRNAs) by RT-qPCR or for primary culture of kidney cells.

Figure 2: Expression of (*Nr3c2*) MR, miR-324-5p, miR-30c-2-3p during the perinatal period

A-B-C. Quantification by RT-qPCR of (*Nr3c2*) MR (A) and miR-324-5p (B), miR-30c-2-3p (C) expression at different developmental stages (E18.5; D0; D8). *Nr3c2* (MR) expression, measured by RT-qPCR, was normalized to that of 18S. Expression of miR-324-5p, miR-30c-2-3p, measured by RT-qPCR, was normalized to that of miR-16. Results are expressed as means \pm SEM of 17, 18 and 20 samples were respectively analyzed at E18.5; D0; D8 by non-parametric ANOVA Kruskal Wallis tests, followed by Dunn's post-test in case of significance. The expression of these transcripts quantified at D0 was arbitrarily set at 1. NS: not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. D-E. Correlation analyses of MR expression and miR-324-5p expression. Linear regression as well as Spearman correlation tests were performed between miR-324-5p (D) or miR-30c-2-3p (E) expression and *Nr3c2* (MR) expression at E18,5 (circle black); D0 (square blue); D8 (triangle green).

Figure 3: Primary cultures of renal cells from kidneys of mice sacrificed at D0 and D8.

A. Morphology of primary cultures of kidney cells isolated from mice sacrificed at D0 and D8.
 B. Immunodetection of MR protein in primary cultures of kidney cells isolated from mice sacrificed at D0 (no MR expression) (left panel) or at D8 (high MR expression) (right panel) revealed by anti-MR-39N antibody (1:5000) (Martinerie et al., 2009b)

Figure 4: Impact of the inhibition of miRNA expression on MR transcript levels in primary cultures of kidney cells isolated from D0 mice

Expression of miR-30c-2-3p (A), *Nr3c2* (MR) (B and D), and miR-324-5p (C) were analyzed by RT-qPCR and normalized to that of miR-16 for miRNAs or *36b4* for MR. Results represent the mean \pm SEM of 12 independent samples for the control (CTR), miR-30c-2-3p inhibitor, and miR-324-5p inhibitor conditions. The expression of these transcripts quantified at D0 was arbitrarily set at 100% for the control condition (CTR). Statistical test used: non-parametric Mann Whitney *U*-tests. NS: not significant; * indicates $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Figure 5: Impact of the inhibition of miRNA expression on MR protein levels in primary cultures of renal cells isolated from D0 mice

A. Western blot analysis of MR expression, 48 h following transfection of CTR Inhibitors or 30c-2-3p Inhibitors (upper panel) and quantification of the corresponding signals (lower panel) in which MR expression, normalized with α -tubulin in CTR Inhibitors condition, was arbitrarily set at 100%. Data are mean \pm SEM (n=4-5). NS: not significant.

B. Western blot analysis of MR expression, 48 h following transfection of CTR Inhibitors or 324-5p Inhibitors (upper panel) and quantification of the corresponding signals (lower panel) in which MR expression, normalized with α -tubulin in CTR Inhibitors condition, was arbitrarily set at 100%. Data are mean \pm SEM (n=4-5). NS: not significant.

Figure 6: Impact of the overexpression of miRNA expression on MR transcript levels in primary cultures of renal cells isolated from D8 mice

Expression of miR-30c-2-3p (A), *Nr3c2* (MR) (B and D), and miR-324-5p (C) were analyzed by RT-qPCR and normalized to that of miR-16 for miRNAs or *36b4* for MR. Results are means \pm SEM of 12 independent samples for the control condition (CTR), Mimics 30c-2-3p, and Mimics 324-5p. The expression of these transcripts quantified at D8 was arbitrarily set at 100% for the control condition (CTR). Statistical test used: non-parametric Mann Whitney *U*-tests. NS: not significant; * indicates $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Figure 7: Impact of the overexpression of miRNA expression on MR protein levels in primary cultures of renal cells isolated from D8 mice

A. Western blot analysis of MR expression, 48 h following transfection of CTR Mimics or Mimics 30c-2-3p (upper panel) and quantification of the corresponding signals (lower panel) in which MR expression, normalized with α -tubulin in CTR Mimics condition was arbitrarily set at 100%. Data are mean \pm SEM (n=4-5). NS: not significant.

B. Western blot analysis of MR expression, 48 h following transfection of CTR Mimics or Mimics 324-5p (upper panel) and quantification of the corresponding signals (lower panel) in which MR expression, normalized with α -tubulin in CTR Mimics condition, was arbitrarily set at 100%. Data are mean \pm SEM (n=4-5). NS: not significant.

Supplemental Tables

Table 1: Reference number of the specific Mimics & Inhibitors used for transfection (Life technologies)

Name	ID	Reference #
324-5p Mimic	MC10253	4464066
30c-2-3p Mimic	MC12646	4464066
negative control Mimic		4464058
324-5p Inhibitor	MH10253	4464084
30c-2-3p Inhibitor	MH12646	4464084
negative control Inhibitor		4464076

Table 2: Primer sequences used for mRNAs RT-qPCR

All primer sequences are shown from 5' to 3'.

Name	Accession Numbers	Amplicon size (pb)	Forward primer	Reverse primer
<i>Nr3c2</i> (MR)	M36074	153	ATGGAACACACACGGTGACCT	AGCCTCATCTCCACACCAAG
<i>18S</i>	X00686	66	CCCTGCCCTTTGTACACACC	CGATCCGAGGGCCTCACTA
<i>Rplp0</i> (36b4)	NM_007475.5	128	AGCGCGTCTGGCATTGTCTGT	GGGAGCAGTGGTGGCAGCAGG

Table 3: miRNA Stem-loop and TaqMan probes used for miRNAs RT-qPCR

miRNAs	Accession Number	Sequences	ID
<i>mmu-miR-30c-2-3p</i>	MIMAT0005438	CTGGGAGAAGGCTGTTACTCT	002110
<i>mmu-miR-324-5p</i>	MIMAT0000555	CGATCCCCTAGGGCATTGGTGT	000539
<i>mmu-miR-16</i>	MIMAT0000527	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG	000391

Table 4: Antibodies used for Western blot analysis

Name (Provider)	Species	Protein	Molecular weight (kDa)	Dilution
Primary antibodies				
39N (generated by our laboratory)	Rabbit	MR	130 kDa	1:1,000 (cells) 1 :5,000 (tissues)
α-Tubulin (Sigma)	Mouse	α-Tubulin	50 kDa	1:5,000
Secondary antibodies				
Dylight Anti-Rabbit 800 (Fisher Scientific)	Goat	Rabbit IgG		1:10,000
Dylight Anti-Mouse 680 (Fisher Scientific)	Rabbit	Mouse IgG		1:10,000

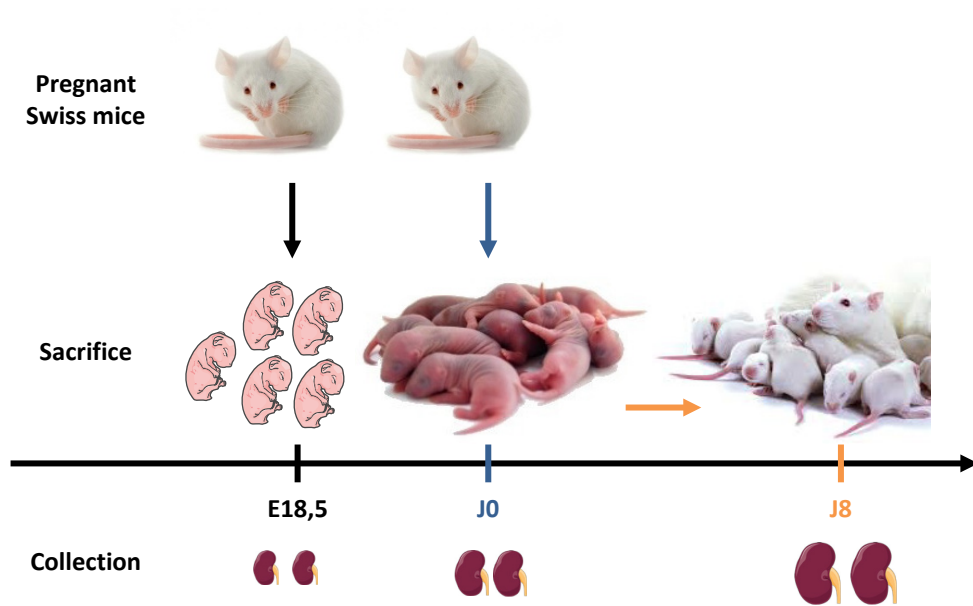


Figure 1: Kidney sampling program at different stages of development in Swiss Mice

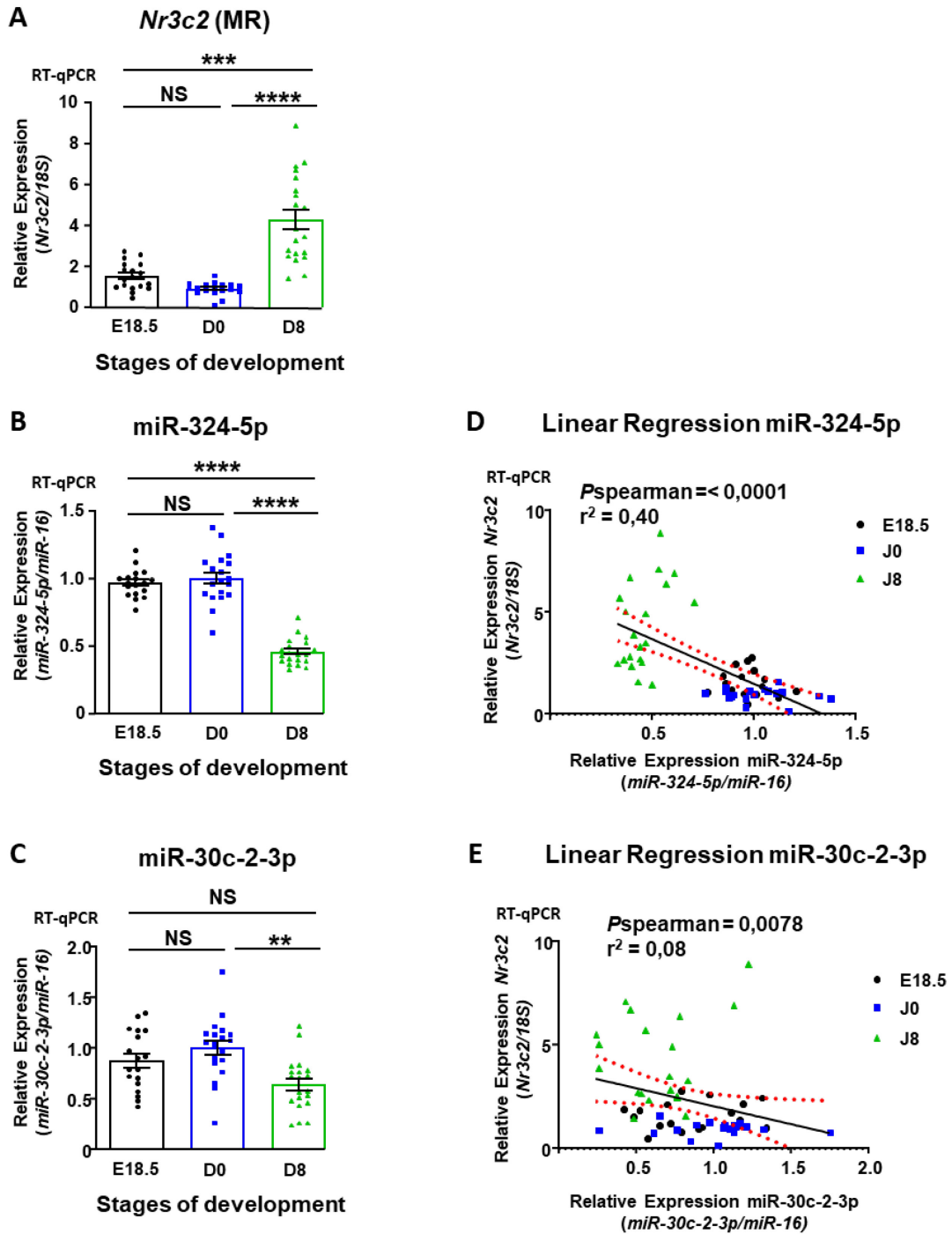


Figure 2: Renal expression of (*NR3C2*) MR, miR-324-5p, miR-30c-2-3p during the perinatal period

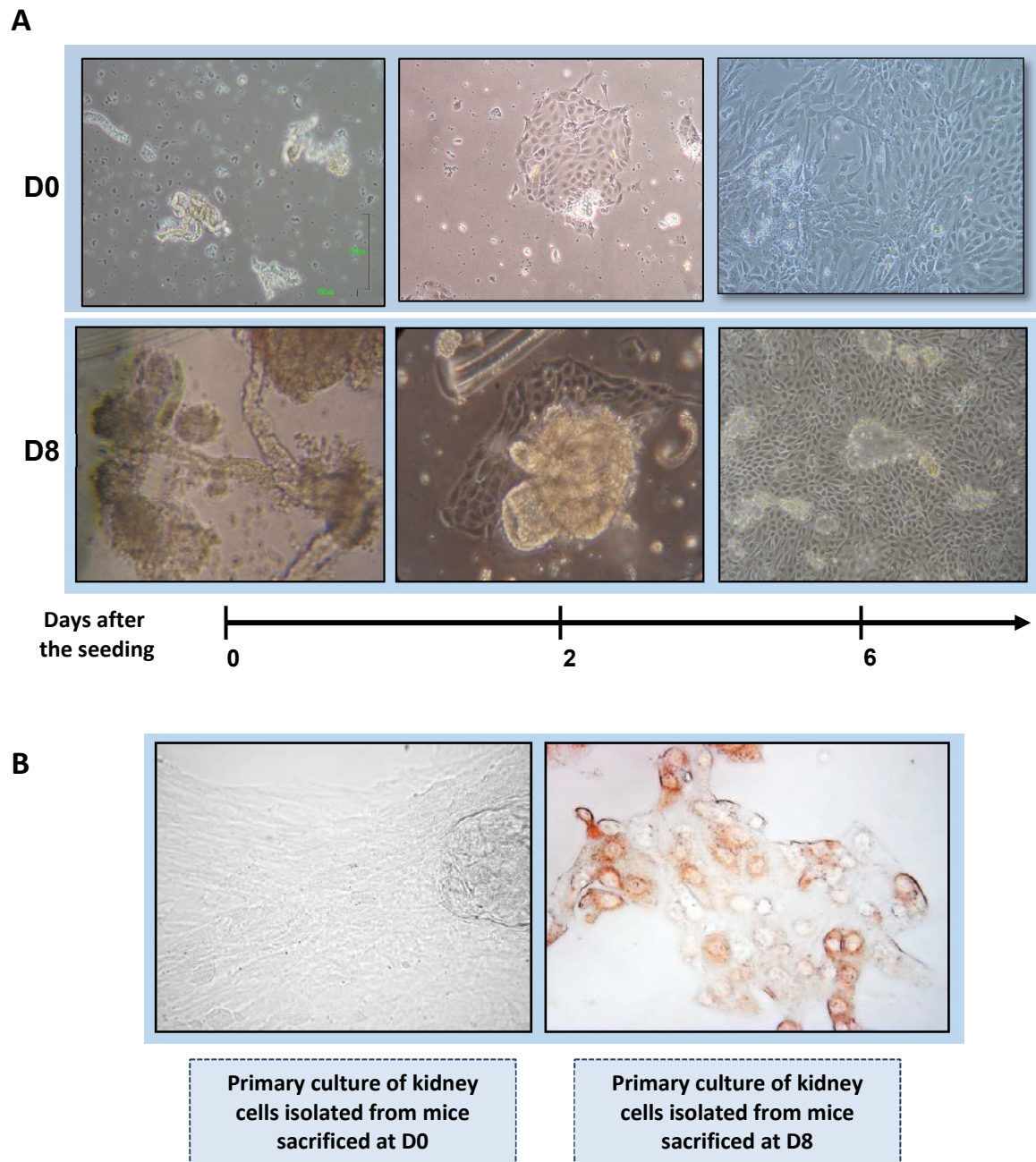


Figure 3: Primary cultures of renal cells isolated from mice sacrificed at D0 and D8

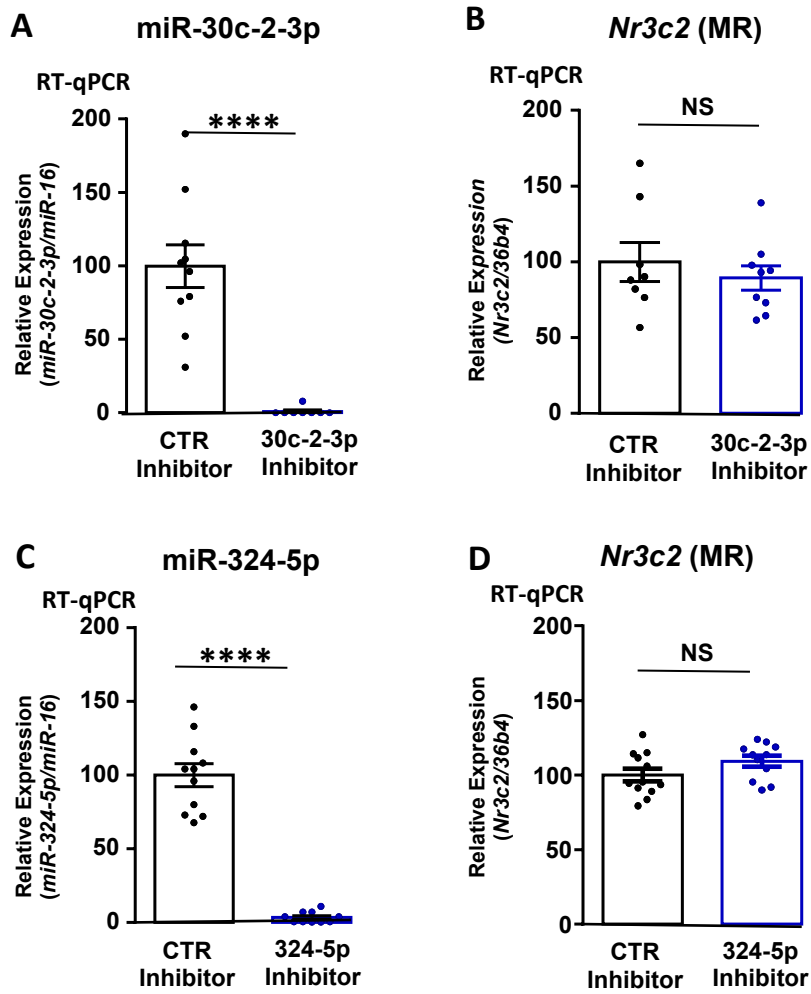


Figure 4: Impact of the inhibition of miRNA expression on MR transcript levels in primary cultures of renal cells isolated from D0 mice

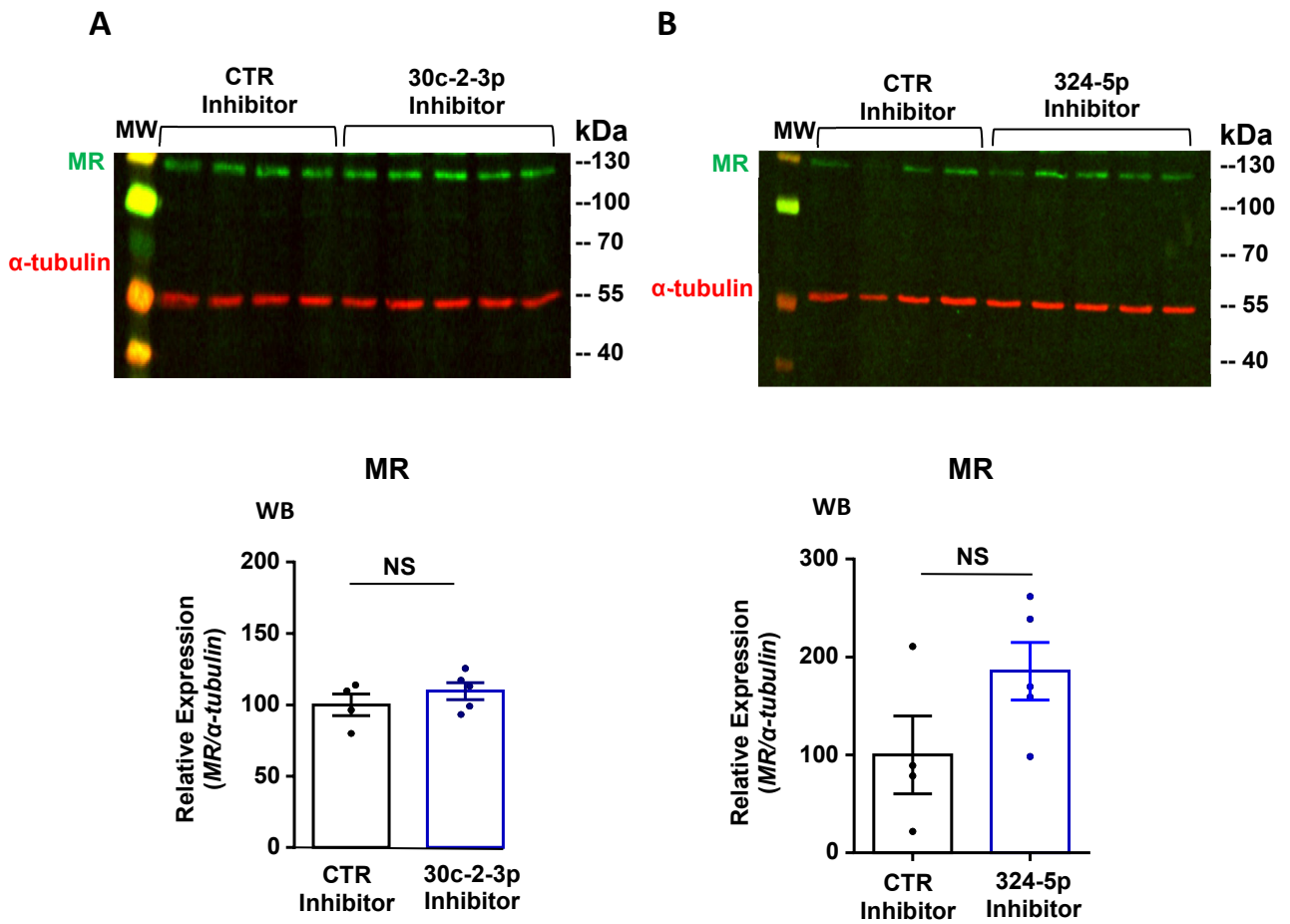


Figure 5: Impact of the inhibition of miRNA expression on MR protein levels in primary cultures of renal cells isolated from D0 mice

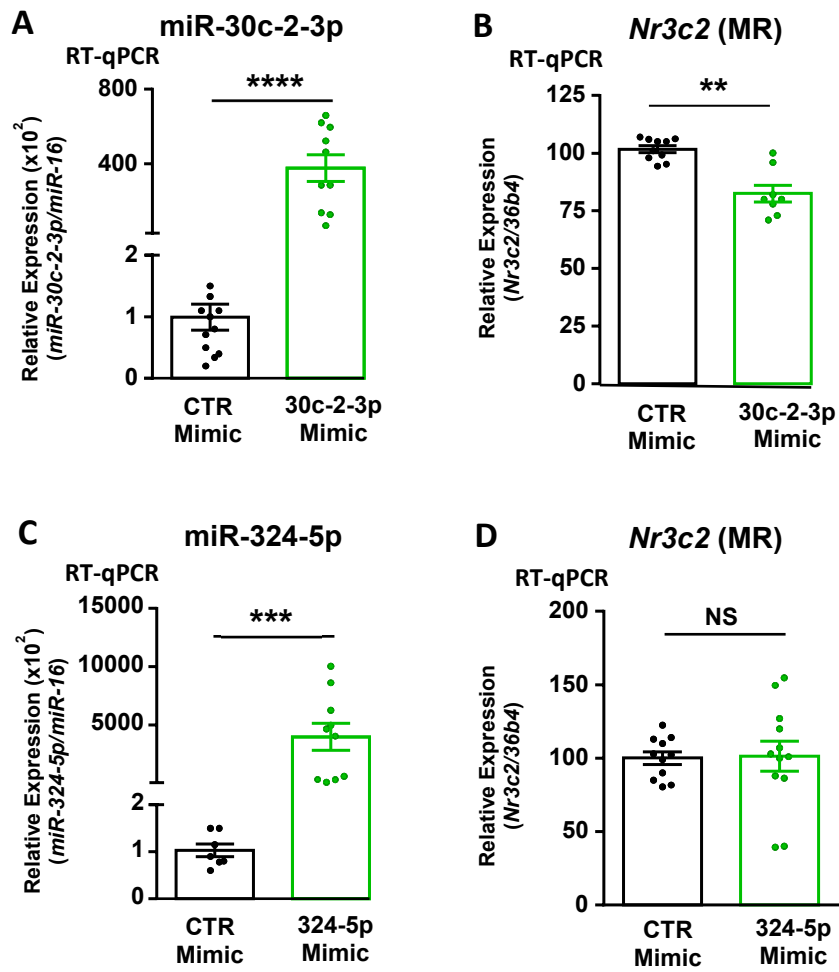


Figure 6: Impact of the overexpression of miRNA expression on MR transcript levels in primary cultures of renal cells isolated from D8 mice

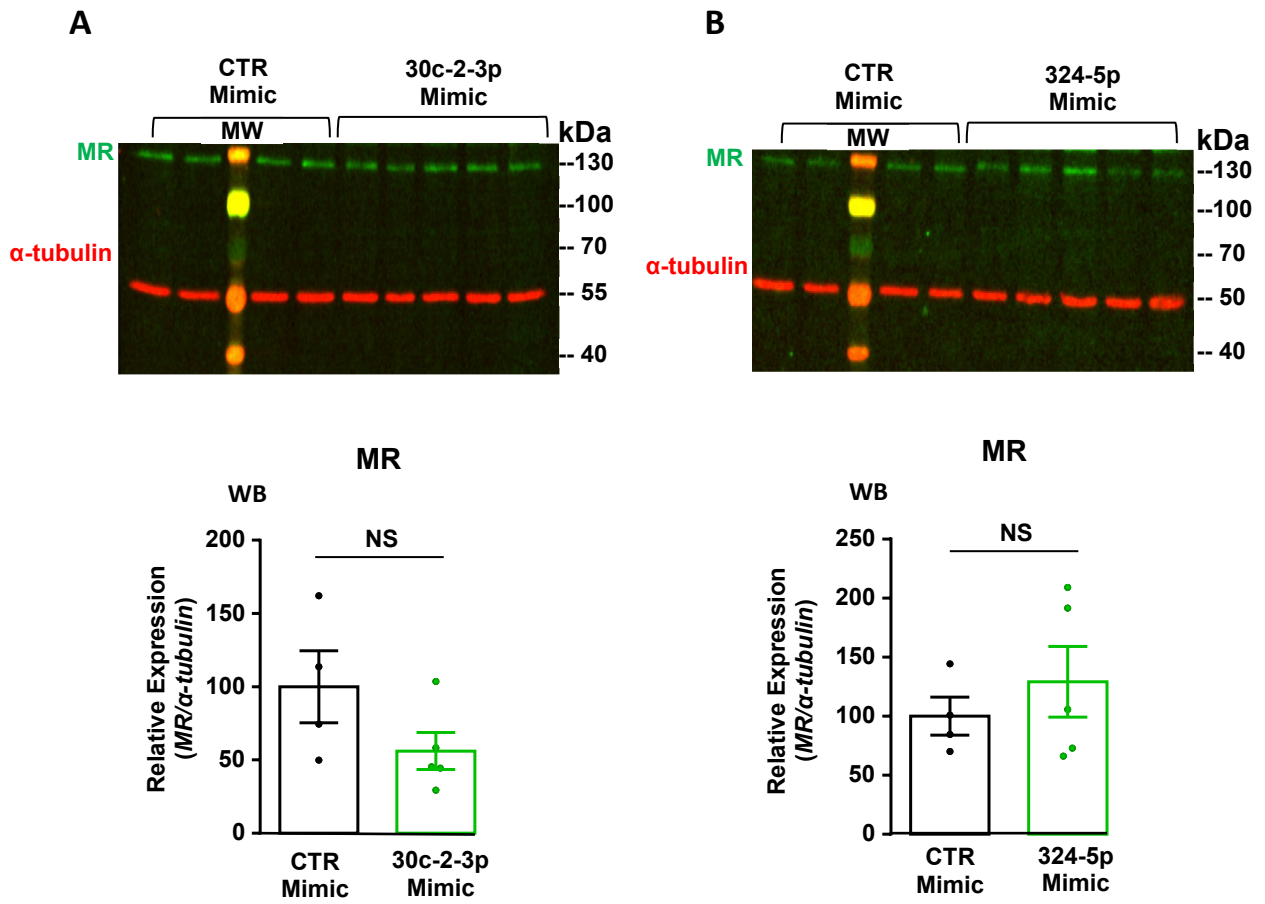


Figure 7: Impact of the overexpression of miRNA expression on MR protein levels in primary cultures of renal cells isolated from D8 mice

3. Éléments de discussion

La naissance représente une étape clé avec le passage d'une vie aquatique intra-utérine à une vie terrestre extra-utérine entraînant une modification de la tonicité environnante à laquelle le nouveau-né doit s'adapter rapidement (Lindower, 2017). Le changement de l'osmolalité du liquide amniotique anténatale (Cheung and Brace, 2005), l'osmolalité dans le tubule rénal du fait de la perte urinaire d'eau et de sel, et la faible teneur en sodium dans le lait maternel peuvent contribuer à la faible expression rénale du MR à la naissance et à l'activation de la voie de signalisation minéralocorticoïde durant la période post-natale immédiate. Plusieurs autres données sont en faveur de la mise en place de mécanismes d'osmorégulation permettant au fœtus de s'adapter à son nouvel environnement et de maintenir un équilibre hydrosodé adéquat. Des expériences réalisées sur des agneaux, exposés *in utero* à une hypertonicité secondaire à une restriction hydrique chez les mères, ont révélé une hausse de la sécrétion de vasopressine associée à une hypertension artérielle (Desai et al., 2003). Il existe aussi des phénomènes adaptatifs comparables chez le poisson, comme cela a été observé chez les saumons lors de leur passage de l'eau de mer (faible expression du MR) à l'eau douce (expression forte du MR) durant leur migration (Kiilerich et al., 2015, 2007).

Récemment, nous avons identifié un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR impliquant le recrutement de deux miARNs (miR-324-5p, miR-30c-2-3p), dont l'expression est induite par l'hypertonicité dans des cellules rénales adultes (Vu et al., 2021, en révision). En outre, nos travaux sur le modèle de cultures primaires de cellules rénales ont montré que ces miARNs pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression rénale du MR durant la période périnatale.

Expression du MR et des miARNs candidats au cours de l'ontogenèse rénale

La quantification par RT-qPCR de l'expression du MR dans des reins de souris sacrifiées à J0 et J8, nous a permis de confirmer que l'expression du MR augmente d'environ 4 à 5 fois entre J0 et J8. Ces résultats, obtenus avec des souris Swiss, confirment les résultats que nous avons précédemment obtenus avec des souris B6D2F1 croisées avec des souris ayant un fond génétique mixte (Martinerie et al., 2013). Cependant, nous n'avons pas retrouvé de baisse significative de l'expression rénale du MR entre E18,5 et J0. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons pris un stade embryonnaire plus tardif (E18,5 au lieu de E17,5) et parce que les souris Swiss ont une durée de gestation plus courte (19 jours contre 21 jours pour les souris B6D2F1). La baisse d'expression rénale du MR (entre E18,5 et J0) peut en effet déjà avoir été amorcée à ce stade tardif du développement fœtal.

De façon intéressante, nous avons observé que miR-324-5p et miR-30c-2-3p ont un profil d'expression qui est en miroir de celui du MR, avec un niveau d'expression important à la naissance et une

diminution de leur expression à J8, de respectivement 54% et 36%. Ces résultats confirment que l'expression de ces deux miARNs dans le rein des souris nouveau-nées et suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle important au cours du développement rénal et ou agir sur la voie de signalisation minéralocorticoïde. De plus, nous avons trouvé une corrélation négative entre l'expression de ces miARNs et l'expression du MR, ce qui corrobore nos hypothèses de travail selon lesquelles les miARNs pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression du MR en période périnatale, notamment pour déstabiliser les transcrits MR à la naissance.

Modèle de cultures primaires de cellules rénales isolées à partir de souris sacrifiées à J0 et J8

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse à ces interrogations, nous avons utilisé un modèle de cultures primaires de cellules rénales isolées à partir de rein de souriceaux sacrifiés à J0 ou à J8. Après 6 jours de culture, les cellules isolées à partir de reins de souris sacrifiées à J8, ressemblent morphologiquement à des cellules épithéliales «adultes» polarisées. Ces cellules expriment le MR (Figure 3B, image à droite) et forment des dômes à confluence, ce qui indique qu'elles pourraient être le siège d'un transport hydro-électrolytique trans-épithélial. En revanche, les cellules rénales isolées à partir de rein de souriceaux sacrifiés à J0 ont une morphologie de cellules épithéliales mais ces cellules n'expriment pas le MR (Figure 3B, image de gauche) et elles ne forment pas de dômes cellulaires. L'ensemble de ces résultats valide donc ce modèle de cultures primaires de cellules rénales car les variations d'expression du MR sont comparables à celles observées *in vivo* chez la souris.

Impact de la modulation de l'expression de ces miARNs sur l'expression du MR

Les travaux présentés dans la 1^{ère} partie du Chapitre Résultats ont permis de montrer que miR-30c-2-3p et miR-324-5p interagissent fonctionnellement avec la région 3'-UTR du transcrit MR (Vu et al., 2021, en révision). Par la suite, nous avons cherché à moduler l'expression de ces miARNs dans un modèle de cultures primaires de cellules isolées à partir de reins de souris sacrifiées à J0 et J8 afin d'analyser l'impact de leur modulation sur l'expression endogène du MR. La transfection des inhibiteurs 30c-2-3p et 324-5p a permis de contrer quasi totalement l'expression de miR-30c-2-3p et de miR-324-5p dans les cellules rénales isolées à partir des reins de souris sacrifiées à J0, validant les conditions de transfection. Cependant, la contre-expression de ces deux miARNs n'a eu aucun impact ni sur le niveau des transcrits *Nr3c2* (MR) ni sur l'expression protéique du MR. Ces résultats semblent indiquer que miR-30c-2-3p et miR-324-5p ne seraient pas impliqués dans l'inhibition de l'expression rénale du MR à J0 dans ce modèle expérimental. Pourtant, ces deux miARNs interagissent fonctionnellement avec la région 3'-UTR du transcrit MR pour le déstabiliser (Vu et al., 2021, en révision). Comment expliquer alors dans ces conditions que ces miARNs, qui modulent l'expression du MR dans le modèle KC3AC1 de cellules rénales «adultes», ne soient pas capables de réguler

l'expression du MR dans ces cellules rénales isolées à partir des reins de souris sacrifiées à J0 ? Pour trancher cette question, il faudrait nécessairement reproduire cette expérience, tester différents temps de transfection et optimiser en augmentant notamment le nombre de réplicats pour les expériences de western Blot. Il est également possible que, dans la mesure où le MR n'est peu ou pas exprimé à ce stade de développement, la régulation du MR passe par d'autres mécanismes qui restent à déterminer.

Au contraire, la surexpression du miR-30c-2-3p et du miR-324-5p, obtenue par transfection de molécules Mimics spécifiques, dans les cellules rénales isolées à partir des reins de souris sacrifiées à J8, a permis d'augmenter de façon spectaculaire le niveau d'expression de miR-30c-2-3p et de miR-324-5p. Pourtant, la surexpression du miR-324-5p n'a pas modifié l'expression génique du transcrit *Nr3c2* (MR). Il y a cependant une petite tendance à l'augmentation de l'expression protéique du MR mais le test statistique n'a pas montré de différence significative compte tenu du nombre de réplicats insuffisants et de la dispersion des points. Dans ces expériences, une baisse de 30% du niveau des transcrits MR a été observée après la transfection du Mimic 30c-2-3p. Ce résultat va dans le sens de notre hypothèse de travail et suggère que miR-30c-2-3p pourrait réguler l'expression rénale du MR durant la période périnatale. Une validation supplémentaire est évidemment à envisager.

Au regard de la littérature, miR-30c-2-3p appartient à la famille des miARNs miR-30 qui est connue pour leur présence dès le stade précoce du développement rénale et leur rôle dans la néphrogenèse tels que la différenciation terminale du pronéphros des amphibiens (Agrawal et al., 2009) ou dans la formation des tubules rénaux (Wessely et al., 2010). Ces données renforcent notre l'hypothèse de leur implication fonctionnelle dans la maturation rénale et potentielle sur l'adaptation en période périnatale. En plus, miR-30c, qui est surexprimé dans les reins, a été décrit comme étant un osmorégulateur crucial chez le tilapia du Nil (Yan et al., 2012a). Cela coïncide avec notre hypothèse que ce miARN participe au changement osmotique du liquide amniotique durant le dernier trimestre de la grossesse et à la naissance. Enfin, le transcrit de la Hsp70 a été identifié comme étant une des cibles directes de miR-30c. En effet, miR-30c régule directement Hsp 70 en ciblant la région 3'-UTR de son transcrit. A noter que la protéine Hsp70 est connue comme étant une des protéines chaperonnes interagissant avec le MR à l'état basal, d'une part pour maintenir le récepteur dans une conformation optimale pour sa liaison à l'aldostérone (Jaglaquier et al., 1996), et d'autre part pour le protéger de la dégradation par le protéasome (Faresse et al., 2010). Notre étude a montré que l'expression du miR-30c-2-3p est faible à J8. Dans ces conditions, il est tentant de penser que la protéine Hsp70 pourrait protéger le MR contre la dégradation par le protéasome. Néanmoins, nous n'avons pas analysé l'expression de Hsp 70 ni d'autres gènes dans notre étude.

Perspectives

Dans l'ensemble, notre étude a donné des résultats intéressants qui mettent en lumière un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR durant la période périnatale. Cependant, cette étude est encore préliminaire et de nombreuses perspectives intéressantes doivent encore être mises en œuvre pour valoriser ce manuscrit :

- 1) Il serait nécessaire d'analyser l'impact de la modulation de l'expression du miR-30c-2-3p sur l'expression d'autres gènes cibles clés de la voie de signalisation minéralocorticoïde tels que *Sgk1*, *Gilz*, ou *Scnn1a* (α ENaC) après stimulation par l'aldostérone.
- 2) Dans la mesure où l'expression du MR ne varie pas au cours du développement dans le poumon, il serait aussi utile de répéter ces expériences avec un modèle de cultures primaires de pneumocytes afin d'évaluer si la régulation de l'expression du MR par ces régulateurs post-transcriptionnels est tissu- et cellule-spécifique.
- 3) Un modèle de prématurité induite par l'injection de lipopolysaccharides (LPS) a été développé par notre équipe (Dumeige et al., 2020). Les Lipopolysaccharides sont des composants de la paroi externe des bacilles à Gram négatif, qui miment une infection maternelle systémique. L'injection intra-péritonéale de LPS à une femelle gestante provoque alors une mise bas prématurée. Comme nous l'avons mentionné dans notre étude, les nouveau-nés prématurés présentent une baisse prolongée de l'expression du MR après la naissance (Dumeige et al., 2020). Il serait donc intéressant d'étudier ce modèle afin d'analyser le profil d'expression du MR et de ces miARNs candidats dans ce modèle physiopathologique. Nous avons récemment déposé et obtenu une validation de ce modèle de prématurité par notre Comité d'Ethique en Expérimentation animale (CEEA CAPSUD n°26, APAFIS number n° 20058/2019021822132339).
- 4) Les protéines de liaison à l'ARN (RBPs) et les miARNs peuvent agir de façon coopérative puisque ces deux classes de régulateurs ciblent la même région 3'-UTR et partagent les mêmes mécanismes de déstabilisation de l'ARNm cible : désadénylation, décoiffage et dégradation de l'ARNm par des enzymes exonucléasiques (Jiang and Coller, 2012). Dans notre étude, nous avons montré que miR-324-5p et miR-30c-2-3p peuvent agir en réseau avec ces RBPs afin de réprimer l'expression du MR dans les cellules rénales « adultes » en réponse à l'hypertonie (Vu et al., 2021, en révision). Il serait ainsi pertinent de tester si miR-30c-2-3p, HuR et Tis11b peuvent coopérer de façon synergique, compétitive ou de façon opposée pour contrôler ou non l'expression rénale du MR durant la période périnatale.

- 5) Nos travaux suggèrent que miR-30c-2-3p semble être un acteur important de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du MR durant la période périnatale. Pourtant, ce miARN n'est vraisemblablement pas le seul miARN impliqué dans le contrôle de l'expression rénale du MR. A la naissance, l'expression du MR est physiologiquement basse. Par conséquent, il nous a semblé intéressant d'identifier, de manière non supervisée, de nouveaux miARNs candidats par une approche de *miR-Sequencing*. Cette approche permettra d'identifier de nouveaux miARNs responsables de la faible expression du MR à la naissance.

- 6) La majorité des miARNs sont présents dans le cytoplasme des cellules de façon cellule-spécifique mais de nombreux miARNs sont aussi retrouvés dans les fluides biologiques comme le plasma ou l'urine (Weber et al., 2010). Leur profil d'expression dans un liquide biologique s'est aussi avéré hautement spécifique en fonction de la pathologie. Ainsi, la quantification des miARNs circulants ou urinaires pourrait faciliter l'identification de nouveaux biomarqueurs invasifs ou non invasifs de diagnostic et/ou de pronostic pour certaines pathologies rénales. Dans le contexte de la prématurité, il serait intéressant de s'interroger si le miR-30c-2-3p et/ou d'autres miARNs (qui restent à identifier) pourraient être utilisés comme des biomarqueurs pronostiques de la sévérité de la perte de sel chez les nouveau-nés à terme ou prématurés, afin de proposer une prise en charge personnalisée.

Conclusion

L'ensemble de ce travail a permis d'apporter des premiers arguments en faveur de notre hypothèse sur l'implication de miR-324-5p, miR-30c-2-3p dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR durant la période périnatale. Au cours de l'ontogénèse, une corrélation négative a été observée entre l'expression de miR-324-5p, miR-30c-2-3p et l'expression du MR. De la même façon, nous avons validé partiellement le modèle de souris Swiss, pour lequel l'expression rénale du MR augmente entre J0 et J8. La stratégie de modulation de l'expression de ces deux miARNs, dans un modèle de cultures primaires de cellules rénales, a également permis de conforter nos hypothèses de travail, au moins pour le miR-30c-2-3p, quant à son implication dans la régulation de l'expression du MR puisqu'une relation de cause à effet a pu être établie entre la surexpression du miR-30c-2-3p et la baisse d'expression rénale du MR.

Il est vraisemblable que la régulation de l'expression du MR en période périnatale puisse impliquer d'autres miARNs ou une coopération avec d'autres régulateurs post-transcriptionnels comme les protéines de liaison à l'ARN (Tis11b ou HuR), dont le rôle dans le contrôle post-transcriptionnel de

l'expression rénale du MR avait déjà été documenté par les travaux de notre équipe (Lema et al., 2017a, 2017b; Viengchareun et al., 2014). Cette régulation est probablement finement régulée de façon temps- et tissu-spécifique, permettant à l'organisme de s'adapter aux multiples variations de son environnement (tonicité extracellulaire, température, stress ...). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant l'expression rénale du MR en période périnatale aura incontestablement un impact majeur sur la prise en charge des nouveau-nés prématurés et ceci pourrait permettre de prévenir l'émergence à l'âge adulte de maladies telles que l'hypertension artérielle ou le syndrome métabolique, plus fréquents dans ces populations fragiles et potentiellement liés à une dysrégulation de l'expression du MR en période postnatale. De plus, ces miARNs sont identifiables et quantifiables dans les échantillons plasmatiques et urinaires chez la souris et l'homme. Ces miARNs seraient donc potentiellement utilisables comme des biomarqueurs pronostiques de la perte de sel notamment chez les nouveau-nés prématurés.

DISCUSSION GENERALE

Le Récepteur Minéralocorticoïde (MR) est un récepteur nucléaire connu pour son rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie hydrosodée par son action dans le néphron distal et dans d'autres tissus épithéliaux. Le MR est également exprimé dans les cellules du système nerveux central, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires, les adipocytes, les cardiomyocytes, les macrophages, les cellules mésangiales glomérulaires, et les podocytes (Nishiyama, 2019). De plus en plus de données indiquent par ailleurs qu'une modification de l'expression du MR peut être associée à l'hypertension, à la fibrose ou à l'inflammation et peut contribuer au développement de lésions dans les tissus rénaux par des mécanismes dépendants ou indépendants de l'aldostérone. Jusqu'à présent, peu d'information était disponible sur les mécanismes de régulation de l'expression du MR. Au cours de cette Thèse de Sciences, nous avons pour objectif principal d'étudier le rôle des miARNs dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR en physiologie et en physiopathologie.

Il existe physiologiquement des variations de tonicité extracellulaire, qui prévalent dans les différents segments néphroniques du fait du gradient cortico-papillaire et du système *vasa recta*. Dans un premier temps, nous avons identifié deux miARNs (miR-324-5p, miR-30c-2-3p), dont l'expression est augmentée en réponse à l'hypertonie. Nous avons montré *in vitro* que ces deux miARNs affectent la stabilité du transcrit MR en se fixant à la région 3'-UTR du MR. Par ailleurs, ces répresseurs post-transcriptionnels agissent de concert avec les RBPs (Tis11b et HuR), qui représentent une autre classe de régulateurs post-transcriptionnels, afin de moduler la stabilité du transcrit MR et donc son niveau d'expression protéique. Nous avons également montré que ces deux miARNs peuvent cibler la région 3'-UTR du transcrit HuR puis réprimer ce transcrit régulant ainsi indirectement l'expression du MR. En outre, les expériences de transfection transitoire dans les cellules HEK 293T, nous ont permis de montrer que chacun de ces miARNs agit de façon additive avec Tis11b pour déstabiliser le transcrit MR. Ces deux régulateurs ont un impact sur la voie de signalisation minéralocorticoïde, puisque qu'ils altèrent l'expression des gènes cibles induits par l'aldostérone (Gilz et/ou Sgk1). Enfin, nous avons observé une augmentation de l'expression de ces deux miARNs dans les reins des souris traitées par le furosémide qui permet de mimer l'hypertonie luminale relative *in vivo*.

Dans un deuxième travail, nous avons cherché à savoir si ce mécanisme de régulation, qui a été identifié dans des cellules rénales adultes, était pertinent durant la période périnatale, où des variations de tonicité sont observées en raison du passage de la vie aquatique intra-amniotique à la vie extra-utérine. Nous avons d'abord montré une corrélation négative entre l'expression de ces deux miARNs avec celle du MR dans les reins de souriceaux obtenus à différents stades foetaux : E18,5 (18 jours pour l'embryon) ; J0 (dès la naissance) et J8 (huitième jour de vie). Ensuite, nous avons modulé

l'expression de ces miARNs dans des cultures primaires de cellules rénales de souris sacrifiées à J0 et J8. Nos résultats ont montré que seule la surexpression du miR-30c-2-3p, à J8, diminue de 30% l'expression du MR, mesurée par RT-qPCR, suggérant que ce miARN pourrait réguler post-transcriptionnellement l'expression du MR. L'impact de la surexpression du miR-30c-2-3p sur l'expression des gènes cibles du MR sera étudié plus tard.

Ainsi, grâce à ce travail de Thèse, nous avons pu mettre en lumière des mécanismes moléculaires par lesquels les miARNs pourraient contrôler l'expression rénale du MR, dans un réseau de gènes, impliqués dans le développement rénal, depuis le rein du « fœtus » jusqu'au rein « adulte », dans des situations physiologiques et physiopathologiques. Nos travaux ont permis de répondre à une grande partie des questions que se posait notre équipe, qui s'intéresse au contrôle post-transcriptionnel de l'expression du MR. Les travaux de l'équipe avaient précédemment démontré l'implication des RBPs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression du MR (Lema et al., 2017a, 2017b; Viengchareun et al., 2014). Mes travaux de recherche ont apporté un éclairage nouveau et original sur le contrôle de l'expression rénale du MR par les miARNs, qui représentent ainsi une seconde classe de régulateurs post-transcriptionnels. Il nous a ensuite semblé pertinent de ne pas restreindre les travaux de cette Thèse uniquement à la caractérisation fonctionnelle de ces miARNs avec le MR mais d'élargir ce travail en étudiant l'importance fonctionnelle de ces miARNs durant la période périnatale où l'expression rénale du MR, qui est très faible, est responsable d'une perte physiologique d'eau et de sel chez les nouveau-nés à terme. Cependant, ce projet n'est pas aussi abouti comme nous l'aurions souhaité pour diverses raisons. Néanmoins, j'ai apporté quelques éléments de discussion afin d'améliorer le projet et mettre en perspective l'ensemble du travail effectué.

Quel est l'impact de ces régulations post-transcriptionnelles sur l'équilibre de la balance hydrosodée ?

En étudiant les miARNs spécifiquement exprimés dans les différents segments tubulaires chez le rat, Mladinov et al ont montré que l'expression des miARNs peut être classée en deux groupes : un groupe dont l'expression est homogène et stable dans tous les segments du néphron et un second groupe, dont l'expression varie au contraire en fonction du segment néphronique (Mladinov et al., 2013). Cette observation est particulièrement intéressante et suggère que les miARNs pourraient agir dans ces segments néphroniques de façon différentielle pour participer à plusieurs processus, incluant le contrôle de l'homéostasie hydrosodée. Notre première hypothèse de travail reposait sur l'observation d'une variation d'expression du MR en fonction de sa localisation dans le cortex où l'osmolarité luminale relative est plutôt hypotonique ou dans la médullaire rénale où l'osmolarité luminale relative

est plutôt hypertonique (Doucet and Katz, 1981; Lombes et al., 1990). Nous avons démontré que les miARNs peuvent réguler post-transcriptionnellement l'expression du MR au niveau rénal. Concrètement, notre étude a montré que miR-324-5p et miR-30c-2-3p, qui sont exprimés dans les cellules principales KC3AC1 issues du canal collecteur cortical, peuvent réguler l'expression rénale du MR en réponse au stress hypertonique, et participer ainsi au contrôle de la réabsorption de sodium. Cependant, ces deux miARNs sont potentiellement exprimés dans d'autres cellules ou d'autres segments néphroniques puisque leur expression est augmentée en réponse au furosémide de 2 à 4 fois dans le rein total alors que cette augmentation n'est que de x 1,5 fois dans les cellules KC3AC1 en réponse au raffinose. Nous avons ensuite montré que ces deux miARNs ciblent le transcrite MR et que la surexpression de ces miARNs a un impact sur l'expression endogène du MR et sur les gènes cibles impliqués dans la réabsorption de sodium après stimulation par l'aldostérone, même si nous n'avons pas formellement démontré un impact sur le transport de sodium. Néanmoins, nous avons observé, comme attendu, une augmentation du volume urinaire et de l'excrétion urinaire de sodium chez les souris soumises à un stress hypertonique à la suite de l'injection de Furosémide (**Figure 21**). Pourtant, dans notre étude, ces deux miARNs semblent agir de façon additive avec Tis11b. Ainsi, il est difficile de différencier dans cette expérience *in vivo* l'origine de l'augmentation de l'excrétion de sodium due à l'action des miARNs et/ou de Tis11b ou d'autres facteurs.

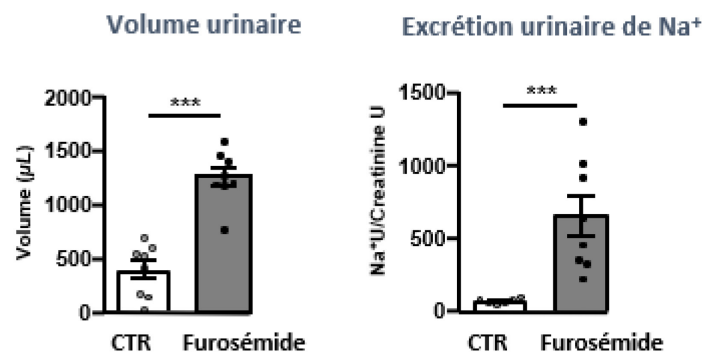


Figure 21 : Impact de Furosémide sur le volume urinaire et l'excrétion urinaire de sodium

Afin d'analyser l'impact exclusif de la surexpression de miR-324-5p et de miR-30c-2-3p, certaines expériences *in vitro* pourraient être proposées telles que le dosage de sodium dans le surnageant de culture après avoir cultivé les cellules KC3AC1 sur des filtres puis transfecté les molécules Mimics 30c-2-3p ou après avoir cultivé sur des filtres les cellules Sh-H8, qui expriment de façon stable le miR-324-5p.

Quelles sont les limites et les perspectives de ce second travail ?

La période périnatale est une période critique englobant trois périodes importantes de la vie : la grossesse, la naissance et la période post-natale. C'est durant cette période que toutes les fonctions physiologiques vitales se mettent en place et en particulier la réabsorption de sodium par les reins (Botwinski and Falco, 2014; Saint-Faust et al., 2014). La réabsorption de sodium dans cette période est liée étroitement au MR et à la voie de signalisation minéralocorticoïde comme cela a été démontré par les travaux du groupe Berger et al, qui ont montré que l'inactivation du gène *Nr3c2* codant le MR est létale dans les 10 premiers jours de vie, en raison d'une déshydratation due au fait d'une perte massive de sel et d'eau chez les souriceaux (Berger et al., 1998). En quantifiant l'expression du MR par RT-qPCR, durant la période périnatale, dans le rein des souris Knockout pour le gène de l'aldostérone synthase (AS), notre équipe a observé un profil d'expression biphasique comparable à celui décrit initialement pour les souris contrôles, ce qui démontre que les taux élevés d'aldostérone ne sont pas responsables des modulations d'expression du MR durant la période périnatale (Martinerie et al., 2011).

Chez l'homme, les nouveau-nés présentent souvent des troubles de la balance hydrosodée au cours du premier mois de vie, qui sont étroitement liés à la régulation de l'expression rénale du MR. La compréhension des mécanismes de régulation du MR en période périnatale pourrait donc faciliter la prise en charge des pertes hydrosodées chez les nouveau-nés, notamment chez les nouveau-nés prématurés. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait disséqué le mécanisme de régulation de l'expression rénale du MR par les miARNs durant cette période.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre l'expression de miR-324-5p, miR-30c-2-3p et l'expression du MR au cours de l'ontogénèse suggérant que ces deux miARNs, régulant post-transcriptionnellement l'expression rénale du MR, pourraient participer au contrôle de l'homéostasie hydrosodée. De façon intéressante, Rahman et al ont récemment étudié le rôle des miARNs plasmatiques dans la régulation du poids à la naissance. Ces auteurs ont indiqué que l'augmentation d'expression de miR-324-5p et de miR-30c-2-3p et d'autres miARNs provenant du placenta sont associés au groupe de nouveau-nés de faible poids à la naissance (Rahman et al., 2018). Ce résultat suggère que les miARNs provenant du placenta durant la période anténatale pourraient jouer un rôle dans la régulation du poids des nouveau-nés à la naissance.

Toutefois, parmi ces deux candidats, nous avons pu seulement démontrer le rôle potentiel du miR-30c-2-3p dans la régulation de l'expression rénale du MR durant la période périnatale, surtout en période post-natale. Ce résultat vient compléter la diversité d'action des membres de la famille de miARNs miR-30 comme cela a été mentionné dans le chapitre Introduction de ce manuscrit de thèse. En effet, plusieurs études ont montré le rôle important de cette famille dans le développement rénal

durant la période prénatale (Ho and Kreidberg, 2013; Trionfini et al., 2015; Wei et al., 2013), et en particulier dans l'homéostasie hydrosodée (Chandrasekaran et al., 2012). La néphrogenèse prénatale comprend trois structures principales : le pronéphros (3^{ème} SG), le mésonephros (4^{ème} SG) et le métanéphros (5^{ème} SG) qui formera le rein définitif du fœtus. Ensuite, la maturation de ce dernier se poursuit jusqu'à la fin de la première année de vie chez le nourrisson (Chandrasekaran et al., 2012; Dressler and Patel, 2015). La surexpression de la famille miR-30 contribue au développement dès le stade pronéphros (Agrawal et al., 2009).

Dans nos expériences préliminaires, la transfection d'inhibiteurs 30c-2-3p n'a pas permis d'augmenter l'expression du MR dans les cultures primaires de cellules isolées de reins de souris sacrifiées à J0. Ce résultat peut sembler étonnant au regard des résultats obtenus à J8 où nous avons observé une baisse modeste de 30 % de l'expression du MR après transfection de Mimics 30c-2-8. L'invalidation ciblée de certains miARNs dans le génome semble avoir rarement des conséquences phénotypiques marquées car un miARN donné n'agit généralement pas de façon isolée mais dans un réseau plus large de régulation (Osella et al., 2011). A noter que tous les membres de la famille miR-30 possèdent des sites de fixation dans la région 3'-UTR du transcrite du MR. Peut-être existe-il une redondance fonctionnelle avec d'autres membres de cette famille miR-30, qui pourraient continuer à réprimer l'expression du MR à J0 ? Il serait donc important de vérifier s'il existe des interactions fonctionnelles entre les membres de cette famille avec la région 3'-UTR du transcrite MR et s'il existe une coopération entre tous les membres de cette famille dans la régulation de l'expression rénale du MR non seulement dans les cellules rénales « adultes » KC3AC1 mais aussi dans les cultures primaires de cellules rénales.

Une autre limite à noter dans les résultats préliminaires que nous avons obtenus réside dans le fait que nous n'avons pas pu montrer d'impact de la modulation de l'expression de ces miARNs sur l'expression protéique du MR. Il serait nécessaire de reproduire ces expériences et d'analyser l'expression protéique du MR à différents temps après la transfection. En outre, il sera essentiel d'analyser l'impact de la surexpression ou de la contre-expression de ces miARNs sur l'expression des gènes cibles du MR tels que *Sgk1*, *Gilz*, ou *Scnn1a* (α ENaC) en présence et/ou absence de l'aldostérone.

Dans le cadre du projet ANR PERIMIRE, notre équipe a programmé d'étudier en parallèle le rôle de Tis11b et de HuR dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR durant la période périnatale. Les résultats préliminaires obtenus par Apolline MEZAIZE, étudiante Master 2 dans notre équipe (2019), confortent également l'hypothèse de travail, puisqu'elle a pu montrer que l'expression protéique de Tis11b est négativement corrélée à celle du MR durant la période périnatale (**Figure 22**). Ainsi, il serait intéressant d'étudier la coopération entre ces deux classes de régulateur post-transcriptionnel dans la régulation de l'expression du MR durant cette période.

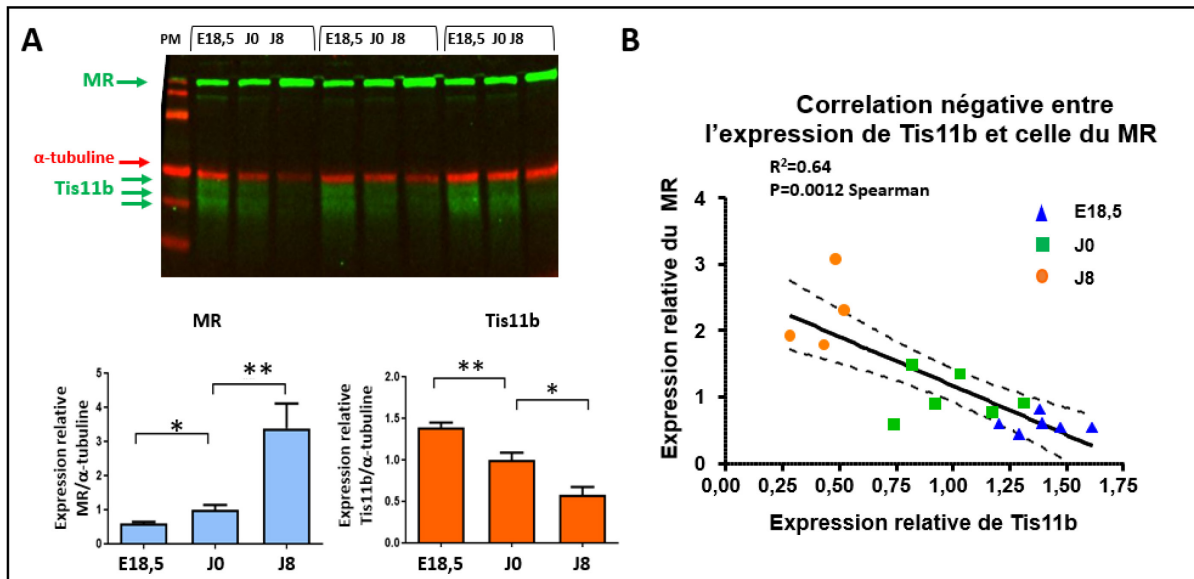


Figure 22 : Corrélation entre l'expression de Tis11b et du MR en période périnatale

(Rapport de Master 2 d'Apolline Mezaize, Université Paris-Saclay)

A. Expression protéique du MR et de Tis11b dans les reins de souris obtenus à différents stades embryonnaires : E18,5, J0, J8

B. Corrélation entre l'expression de Tis11b et du MR

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart standard à la moyenne (SEM). (n=4 par condition). L'expression du MR ou de Tis11b a été normalisée à celle de l' α -Tubuline dans chaque condition. L'expression protéique du MR ou de Tis11b, quantifiée à J0, a été arbitrairement fixée à 1.

Analyse statistique utilisée : test non paramétrique de Kruskal Wallis, suivi d'un post test de Dunn's en cas de significativité. NS : non significatif ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Une régression linéaire ainsi qu'un test de corrélation de Spearman ont été réalisées entre l'expression de Tis11b et du MR

Ces mécanismes post-transcriptionnels sont-ils mis jeu chez les nouveau-nés prématurés ?

L'une de nos hypothèses de travail reposait initialement sur l'observation clinique de la perte de poids consécutive à la fuite urinaire d'eau et de sel physiologiquement observée chez les nouveau-nés à terme. Cependant, cette fuite urinaire d'eau et de sel est prolongée chez les grands prématurés (Martinerie et al., 2015). Ces nouveau-nés fragiles présentent en effet à la naissance une immaturité rénale, responsable d'une perte urinaire accrue de sodium et d'eau, dans un contexte d'interruption précoce de la néphrogenèse et d'immaturité globale des processus de transport tubulaire dans les différents segments néphroniques (Gubhaju et al., 2014). De plus, notre équipe a mis en évidence une diminution d'expression des transcrits et de la protéine MR, ainsi que de la 11 β HSD2 à la naissance chez les nouveau-nés prématurés, suggérant une très faible activation de la voie minéralocorticoïde,

ce qui semble concordant avec la perte urinaire d'eau et de sel plus importante chez ces patients à la naissance (Dumeige et al., 2020). Nous programmons d'analyser l'expression rénale de miR-324-5p et de miR-30c-2-3p dans le modèle murin de prématurité que nous avons développé dans l'équipe.

De façon intéressante, de plus en plus de miARNs circulants ou urinaires sont maintenant utilisés comme des biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques de la sévérité de certaines maladies. Par exemple, la quantification de l'expression miR-150-5p plasmatique chez la femme enceinte au premier trimestre pourrait prévenir le risque d'un accouchement prématuré (Cook et al., 2019). Un autre exemple est illustré par la quantification de l'expression du miR-876-3p dans les exosomes du liquide de lavage bronchoalvéolaire (Lal et al., 2018) ou de l'expression du miR-495-5p sérique (Sun et al., 2020), qui pourraient prévenir la sévérité de la dysplasie bronchopulmonaire chez les prématurés atteints de dysplasie bronchopulmonaire. En outre, les Mimics et/ou Inhibiteurs de miARNs pourraient être utilisés comme des agents thérapeutiques potentiels pour certaines maladies. Le Miravirsen (l'antisens du miR-122) est par exemple utilisé en clinique pour inhiber la réplication du virus de l'hépatite C. Ce médicament a déjà été validé avec succès dans un essai clinique de phase II (Bonneau et al., 2019; Lanford et al., 2010; Rupaimoole and Slack, 2017; van der Ree et al., 2014). Dans ce contexte, nous souhaiterions quantifier l'expression des miARNs urinaires candidats et corrélérer cette expression avec la sévérité de la perte sodée chez les nouveau-nés prématurés. Cela permettra d'évaluer si ces miARNs pourraient être utilisés comme des cibles thérapeutiques ou des biomarqueurs pronostiques, pouvant améliorer la prise en charge de ces enfants prématurés.

Quelle est l'action de ces miARNs sur l'expression du GR et la voie de signalisation glucocorticoïde ?

Plusieurs arguments plaident en faveur d'une action de ces miARNs sur l'expression du Récepteur Glucocorticoïde (GR). En effet, le MR et le GR sont deux récepteurs nucléaires relativement proches par leur structure moléculaire, leur mode de fonctionnement, leurs gènes cibles communs ainsi que par leurs ligands (aldostérone et cortisol). Ils sont également exprimés de manière concomitante dans de nombreux tissus, suggérant de possibles dialogues croisés ou des fonctions communes (Farman and Rafestin-Oblin, 2001). Durant la période périnatale, il y a une diminution remarquable de l'expression rénale du MR, qui est associée à une expression très faible voire nulle de la 11 β HSD2 dans les parties distales du néphron à la fois chez l'homme et chez la souris. Ceci suggère l'existence d'une fenêtre temporelle d'action pour la voie de signalisation glucocorticoïde dans la cellule tubulaire rénale pendant cette période périnatale (Martinerie et al., 2009b). A noter que les travaux de notre équipe ont montré que l'expression des gènes cibles communs du MR et du GR (α ENaC, Sgk1, Gilz) est augmentée dans le rein des souriceaux nés prématurément (Dumeige et al., 2020). L'ensemble de ces

résultats renforce l'importance d'étudier le lien entre les miARNs candidats (miR-324-5p, miR-30c-2-3p ou d'autres) avec le transcrit GR et la voie minéralocorticoïde. Bien que l'analyse bio-informatique réalisée avec le logiciel de prédiction Targetscan (Agarwal et al., 2015) ne nous ait pas permis d'identifier des sites de fixation putatifs pour miR-30c-2-3p et miR-324-5p dans la région 3'-UTR du transcrit GR, nous avons identifié dans cette région 3'-UTR des sites de fixation putatifs pour d'autres membres de la famille des miARNs miR-30 notamment pour miR-30c, miR-30b, miR-30d et miR-30e (Agarwal et al., 2015), suggérant qu'il puisse exister un dialogue croisé avec l'expression du GR.

Quels rôles pourraient jouer les miARNs candidats dans d'autres pathologies rénales affectant la voie de signalisation minéralocorticoïde ?

Au cours de ces dernières années, beaucoup d'attention a été portée sur l'étude de la voie de signalisation minéralocorticoïde en raison de son rôle essentiel dans l'homéostasie hydrosodée (Martinerie et al., 2013) mais aussi en raison de son implication dans de nombreuses pathologies humaines, en particulier des pathologies cardio-rénales (hypertension artérielle, néphropathie diabétique, insuffisance rénale, fibrose rénale). Plusieurs études ont, par exemple, rapporté que l'activation inappropriée du MR dans les cellules rénales contribue aux lésions rénales par des mécanismes dépendants ou indépendants de l'aldostérone. En effet, certains auteurs ont montré que l'expression rénale du MR, quantifiée dans 95 biopsies rénales, est augmentée et corrélée avec la gravité de la protéinurie chez les patients atteints de néphropathie (Quinkler et al., 2005). Par ailleurs, le rôle de l'aldostérone et/ou de l'activation du MR dans la néphropathie diabétique ont été démontrés dans des modèles expérimentaux de diabète de type 1 et type 2 (Lee et al., 2009; Taira et al., 2008). Dans ces modèles, l'activation du MR est impliquée dans l'étiologie de la pathologie (Ueda and Nagase, 2014) en favorisant la fibrose rénale, qui est associée à une hypertension sensible au sel et à la protéinurie. Ainsi, l'inhibition pharmacologique du MR avec un antagoniste prévient la fibrose rénale et l'augmentation de l'expression du TGF- β (*Transforming growth factor beta*), du PAI-1, des collagènes de type 1 et 4, et de la fibronectine ainsi que le stress oxydatif localement (Dojki and Bakris, 2017; Jaisser and Farman, 2016; Nishiyama, 2019; Ocello et al., 2019). Ces données confirment le rôle néfaste de la surexpression ou de l'hyperactivation du MR ainsi que les bénéfices thérapeutiques de l'utilisation d'un antagoniste du MR.

Parmi les maladies rénales affectant la voie de signalisation minéralocorticoïde, nous nous sommes intéressés, dans un projet ancillaire, à la néphropathie diabétique (DN), qui représente une des complications sévères du diabète. La néphropathie diabétique est définie cliniquement par la présence d'une albuminurie persistante avec un rapport urinaire albumine/créatinine [RAC] ≥ 30 mg/g pendant au moins 3 mois et/ou d'une réduction du débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) < 60 ml/min/1,73 m² (Navaneethan et al., 2021). Environ 25 à 40 % des patients souffrant de

diabète, qu'il soit de type I (T1D) ou de type II (T2D), se verront diagnostiquer ultérieurement une néphropathie diabétique (Conserva et al., 2013). Des données récentes montrent que la néphropathie diabétique comprend un état inflammatoire intense déclenché par des effets métaboliques et hémodynamiques accompagnés d'une forte protéinurie et de lésions vasculaires entraînant une fibrose myocardique et rénale (Tang et al., 2016). Les différents stades de la néphropathie diabétique comprennent l'hypertrophie glomérulaire, la microalbuminurie, l'albuminurie manifeste et une diminution du débit de filtration glomérulaire. Une fois que la protéinurie se manifeste et s'installe, l'évolution de la maladie est de mauvais pronostic car la maladie devient irréversible (Goenka et al., 2019). Il est donc essentiel de poser un diagnostic précoce et de commencer un traitement par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ou des antagonistes du récepteur de l'angiotensine II (ARA) pour réduire de manière significative la protéinurie et l'hypertension, mais la prévention de l'insuffisance rénale terminale (IRT) n'est pas optimale en raison de plusieurs facteurs, notamment l'augmentation paradoxale des taux d'aldostérone lors de l'administration à long terme d'IEC/ARA, appelée "percée de l'aldostérone" (Xue et al., 2017). De plus, l'hypertension dans la maladie rénale chronique en général et dans la néphropathie diabétique en particulier, nécessite l'administration de deux médicaments, chez la majorité des patients. L'idéal serait donc de trouver des approches nouvelles et originales pour contrer cet hyperaldostéronisme tout en accentuant les effets anti-hypertenseurs et anti-protéinuriques de ces agents, et les antagonistes du MR semblent parfaitement convenir dans cette indication. Cependant, il est nécessaire d'évaluer la sécurité pharmacologique et l'efficacité des antagonistes du MR dans la néphropathie diabétique.

L'albuminurie est un signe précoce de la maladie rénale diabétique (MRD), mais ce n'est pas un facteur prédictif fort. En raison de leur grande stabilité, les miARNs exosomaux urinaires peuvent être des biomarqueurs prédictifs utiles à l'analyse/l'évaluation de la progression de la maladie rénale diabétique à un stade précoce vers l'insuffisance rénale. Ainsi, il serait intéressant d'identifier de nouveaux miARNs à la fois régulant l'expression rénale du MR et présentant un profil d'expression différent entre les patients atteints de diabète de type 2 (T2D) avec et sans macroalbuminurie (Xie et al., 2017). La quantification de l'expression de ces miARNs dans le plasma et l'urine pourrait favoriser l'identification de biomarqueurs pronostiques de l'évolution de la maladie chez les patients diabétiques et/ou pendant la surveillance de l'efficacité du traitement par l'antagoniste du MR chez ces patients.

Dans ce contexte, nous avons formulé l'hypothèse que ces deux miARNs (miR-324-5p et miR-30c-2-3p) mais aussi d'autres miARNs pourraient être sécrétés dans les urines et servir comme biomarqueurs non invasifs pour le diagnostic au stade précoce de la néphropathie mais aussi pour l'évaluation thérapeutique de l'efficacité du traitement par l'antagoniste du MR.

De façon intéressante, nous avons tenté de quantifier, dans une expérience pilote, l'expression de miR-324-5p et du miR-30c-2-3p dans les exosomes des surnageants du milieu de culture après avoir cultivé les cellules rénales KC3AC1 sur des filtres Transwell et incubé en condition hypertonique dans le compartiment apical (**Figure 23**).

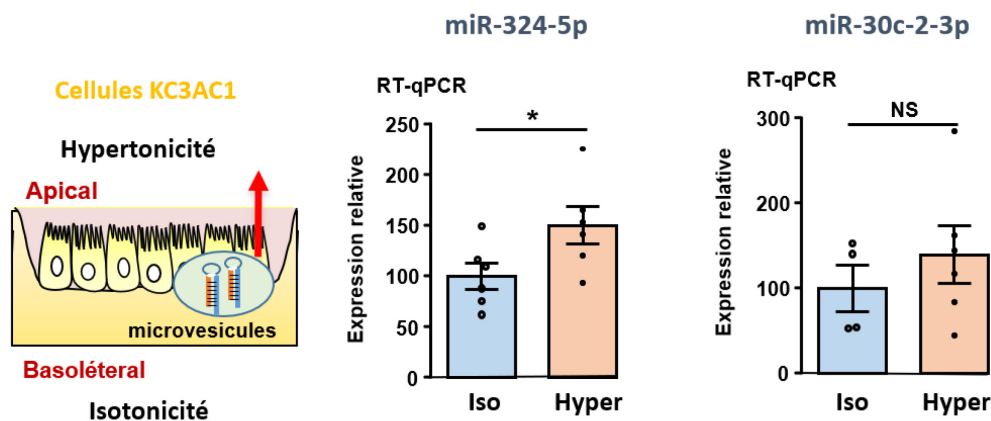


Figure 23 : Sécration de miR-324-5p et de miR-30c-2-3p en réponse à l'hypertonie

Les cellules rénales KC3AC1 ont été cultivées sur des filtres transwell à raison de 10^6 cellules/filtre. Au 7^e jour, elles ont été incubées dans le compartiment apical en présence d'un milieu isotonique ou hypertonique pendant 6 h (n=6 par condition). 500 μ L de surnageant ont ensuite été prélevés. Les miARNs ont été extraits à partir des exosomes présents dans le surnageant de culture grâce au kit de Macherey Nagel. L'expression du miR-324-5p et miR-30c-2-3p dans les exosomes ont été quantifiées par RT-qPCR. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne (SEM) (n=6 par condition). L'expression du miR-324-5p ou du miR-30c-2-3p a été normalisée au coefficient de la moyenne géométrique GeNorm du miR-16, U6, miR-93-5p dans chaque condition. L'expression de ces miARNs quantifiée dans la condition isotonique a été arbitrairement fixée à 100 %. Test statistique utilisé : U-test non paramétrique de Mann Whitney NS : non significatif ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Ce résultat indique que les miARNs peuvent être sécrétés dans le milieu de culture et qu'il est possible de quantifier l'expression de ces miARNs dans le surnageant de culture cellulaire, et par extension dans les liquides biologiques. Nous collaborons actuellement avec le Centre d'Investigation Clinique (CIC) à Poitiers qui dispose d'échantillons urinaires et plasmatiques de patients diabétiques atteints de néphropathie, avant et après un traitement par un antagoniste du MR. La quantification des miARNs urinaires et leur corrélation avec la sévérité de l'albuminurie, la fonction rénale reflétée par le DFGe permettraient d'évaluer s'ils peuvent être utilisés comme des biomarqueurs pronostiques de l'évolution de la maladie et/ou d'évaluer l'efficacité thérapeutique du traitement par l'antagoniste du MR.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ces dernières années, beaucoup d'attention a été portée sur le MR en raison de son rôle essentiel dans l'homéostasie hydrosodée (Martinerie et al., 2013) mais aussi en raison de son implication dans de nombreuses pathologies, en particulier des pathologies cardio-rénales. La compréhension des mécanismes de régulation de son expression au niveau rénal permettra de faciliter la prise en charge des patients atteints des maladies rénales affectant la voie de signalisation minéralocorticoïde. Au cours de cette Thèse de Sciences, notre objectif était d'étudier le rôle des miARNs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR en physiologie et en pathophysiologie. Mon travail de recherche a abouti à un article principal dont je suis en premier auteur et qui est actuellement en révision. Un autre article est en préparation et deux revues ont été publiées (voir annexes).

La première partie de mon travail de thèse a mis en lumière un nouveau mécanisme de régulation post-transcriptionnel impliquant le recrutement de deux miARNs (miR-324-5p et miR-30c-2-3p) capables de moduler la stabilité du transcrit MR. Ce mécanisme de régulation par les miARNs vient en complément du mécanisme que nous avons déjà décrit avec les protéines de liaison à l'ARN. Cette régulation post-transcriptionnelle permet aux cellules rénales de s'adapter très rapidement au stress osmotique. Ces miARNs peuvent réprimer l'expression du MR soit directement après avoir ciblé la région 3'-UTR du transcrit MR, soit indirectement en déstabilisant le transcrit HuR, facteur qui, au contraire, stabilise le transcrit MR. Par ailleurs, chacun de ces miARNs semble pouvoir agir de façon additive avec Tis11b pour déstabiliser le transcrit MR. Ces régulateurs post-transcriptionnels ont un impact sur la voie de signalisation minéralocorticoïde, puisque nous avons observé une réponse altérée de l'expression des gènes cibles précoces du MR (Gilz et/ou Sgk1) induite par l'aldostérone.

La seconde partie a permis d'étudier la pertinence physiologique du rôle de ces deux miARNs dans la régulation de l'expression rénale du MR durant la période périnatale où des variations de tonicité sont observées en raison du passage de la vie aquatique intra-amniotique à la vie extra-utérine. Nous avons d'abord montré une corrélation négative entre l'expression de ces deux miARNs avec celle du MR dans le rein de souriceaux obtenus à différents stades foetaux. L'impact de ces modulations sur l'expression du MR a été étudié dans des cultures primaires de souris sacrifiées à J0 et J8. Les résultats préliminaires ont permis de suggérer l'implication du miR-30c-2-3p dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression du MR. Cependant, l'impact de la surexpression du miR-30c-2-3p sur l'expression des gènes cibles du MR et le transport de sodium reste à démontrer.

Cette étude devrait permettre de prédire si ces miARNs sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR durant la période périnatale qui est associée à une perte de poids physiologique consécutive à la perte urinaire de sel et l'eau chez les nouveau-nés. Par ailleurs, cette étude ouvre des perspectives pour évaluer s'il existe un mécanisme de coopération entre ces miARNs et les protéines de liaison à l'ARN, et pour vérifier si ce même mécanisme est mis en jeu chez les prématurés qui présentent souvent une perte exacerbée et prolongée de sel et d'eau. Le rôle de ces deux miARNs pourrait également être étendu dans la néphropathie diabétique ou d'autres maladies rénales affectant la voie de signalisation minéralocorticoïde.

En conclusion, l'ensemble de ce travail a apporté des éléments nouveaux sur la régulation post-transcriptionnelle de l'expression rénale du MR en physiologie et physiopathologie par deux miARNs (miR-324-5p, miR-30c-2-3p). Bien que les objectifs attendus de ce projet de thèse ne soient pas complètement atteints comme nos attentes, ce travail de thèse a donné une base solide et ouvre des perspectives prometteuses sur l'utilisation des miARNs comme biomarqueurs pronostiques, facilitant et/ou améliorant ainsi la prise en charge des patients atteints de maladies rénales affectant la voie minéralocorticoïde, notamment les sujets plus fragiles comme les nouveau-nés prématurés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel Mohsen, A.H., Taha, G., Kamel, B.A., Maksood, M.A., 2016. Evaluation of aldosterone excretion in very low birth weight infants. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transplant. Saudi Arab.* 27, 726–732. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.185234>
- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., Bartel, D.P., 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Agrawal, R., Tran, U., Wessely, O., 2009. The miR-30 miRNA family regulates *Xenopus* pronephros development and targets the transcription factor *Xlim1/Lhx1*. *Dev. Camb. Engl.* 136, 3927–3936. <https://doi.org/10.1242/dev.037432>
- Aguado-Fraile, E., Ramos, E., Conde, E., Rodríguez, M., Liaño, F., García-Bermejo, M.L., 2013. MicroRNAs in the kidney: novel biomarkers of acute kidney injury. *Nefrol. Publicacion Of. Soc. Espanola Nefrol.* 33, 826–834. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2013.Aug.12198>
- Aguado-Fraile, E., Ramos, E., Sáenz-Morales, D., Conde, E., Blanco-Sánchez, I., Stamatakis, K., del Peso, L., Cuppen, E., Brüne, B., Bermejo, M.L.G., 2012. miR-127 protects proximal tubule cells against ischemia/reperfusion: identification of kinesin family member 3B as miR-127 target. *PLoS One* 7, e44305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044305>
- Amrouche, L., Bonifay, R., Anglicheau, D., 2011. [MicroRNAs in pathophysiology of renal disease: an increasing interest]. *Med. Sci. MS* 27, 398–404. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274016>
- Arriza, J.L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T.M., Handelin, B.L., Housman, D.E., Evans, R.M., 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237, 268–275. <https://doi.org/10.1126/science.3037703>
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F., Tewari, M., 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>
- Ashton, A.W., Le, T.Y.L., Gomez-Sanchez, C.E., Morel-Kopp, M.-C., McWhinney, B., Hudson, A., Mihailidou, A.S., 2015. Role of Nongenomic Signaling Pathways Activated by Aldosterone During Cardiac Reperfusion Injury. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 29, 1144–1155. <https://doi.org/10.1210/ME.2014-1410>
- Ayrout, M., Simon, V., Bernard, V., Binart, N., Cohen-Tannoudji, J., Lombès, M., Chauvin, S., 2017. A novel non genomic glucocorticoid signaling mediated by a membrane palmitoylated glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in gonadotrope cells. *Sci. Rep.* 7, 1537. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01777-2>

- Bachmann, S., Bostanjoglo, M., Schmitt, R., Ellison, D.H., 1999. Sodium transport-related proteins in the mammalian distal nephron - distribution, ontogeny and functional aspects. *Anat. Embryol. (Berl.)* 200, 447–468. <https://doi.org/10.1007/s004290050294>
- Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P., Kiledjian, M., 2010. Differential regulation of microRNA stability. *RNA* 16, 1032–1039. <https://doi.org/10.1261/rna.1851510>
- Baraton, L., Ancel, P.Y., Flamant, C., Orsonneau, J.L., Darmaun, D., Rozé, J.C., 2009. Impact of changes in serum sodium levels on 2-year neurologic outcomes for very preterm neonates. *Pediatrics* 124, e655-661. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-3415>
- Bartel, D.P., 2018. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173, 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bassett, M.H., White, P.C., Rainey, W.E., 2004. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 217, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.011>
- Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K., Calin, G.A., 2017. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol. Oncol.* 11, 1673–1686. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12144>
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., Izaurralde, E., 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20, 1885–1898. <https://doi.org/10.1101/gad.1424106>
- Berger, S., Bleich, M., Schmid, W., Cole, T.J., Peters, J., Watanabe, H., Kriz, W., Warth, R., Greger, R., Schütz, G., 1998. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9424–9429.
- Bernardo, B.C., Charchar, F.J., Lin, R.C.Y., McMullen, J.R., 2012. A microRNA guide for clinicians and basic scientists: background and experimental techniques. *Heart Lung Circ.* 21, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2011.11.002>
- Bertocchio, J.-P., 2020. Physiologie tubulaire par segments, in: *Néphrologie de l'enfant*, Pedia. Elsevier Masson.
- Bertocchio, J.-P., Warnock, D.G., Jaisser, F., 2011. Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 79, 1051–1060. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.48>
- Bhalla, V., Daidié, D., Li, H., Pao, A.C., LaGrange, L.P., Wang, J., Vandewalle, A., Stockand, J.D., Staub, O., Pearce, D., 2005. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing

- interaction with 14-3-3. *Mol. Endocrinol.* Baltim. Md 19, 3073–3084.
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0193>
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111–1124.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.031>
- Biemesderfer, D., Pizzonia, J., Abu-Alfa, A., Exner, M., Reilly, R., Igarashi, P., Aronson, P.S., 1993. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am. J. Physiol.* 265, F736–742.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1993.265.5.F736>
- Bizzarri, C., Pedicelli, S., Cappa, M., Cianfarani, S., 2016. Water Balance and “Salt Wasting” in the First Year of Life: The Role of Aldosterone-Signaling Defects. *Horm. Res. Paediatr.* 86, 143–153.
<https://doi.org/10.1159/000449057>
- Blondel, B., Coulm, B., Bonnet, C., Goffinet, F., Le Ray, C., National Coordination Group of the National Perinatal Surveys, 2017. Trends in perinatal health in metropolitan France from 1995 to 2016: Results from the French National Perinatal Surveys. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 46, 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2017.09.002>
- Bollag, W.B., 2014. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr. Physiol.* 4, 1017–1055.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c130037>
- Bonneau, E., Neveu, B., Kostantin, E., Tsongalis, G.J., De Guire, V., 2019. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC* 30, 114–127.
- Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
- Botwinski, C.A., Falco, G.A., 2014. Transition to postnatal renal function. *J. Perinat. Neonatal Nurs.* 28, 150–154;E3–4. <https://doi.org/10.1097/JPN.0000000000000024>
- Boulkroun, S., Fay, M., Zennaro, M.-C., Escoubet, B., Jaisser, F., Blot-Chabaud, M., Farman, N., Courtois-Coutry, N., 2002. Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene. *J. Biol. Chem.* 277, 31506–31515.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M200272200>
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3, e85. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085>
- Bruner, K.L., Derfoul, A., Robertson, N.M., Guerriero, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., Litwack, G., 1997. The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept. Signal Transduct.* 7, 85–98.
- Bruno, I.G., Karam, R., Huang, L., Bhardwaj, A., Lou, C.H., Shum, E.Y., Song, H.-W., Corbett, M.A., Gifford, W.D., Gecz, J., Pfaff, S.L., Wilkinson, M.F., 2011. Identification of a microRNA that

- activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay. *Mol. Cell* 42, 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.018>
- Burnstock, G., Loesch, A., 2017. Sympathetic innervation of the kidney in health and disease: Emphasis on the role of purinergic cotransmission. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 204, 4–16. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.05.007>
- Çakmak, H.A., Demir, M., 2020. MicroRNA and Cardiovascular Diseases. *Balk. Med. J.* 37, 60–71. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.1.94>
- Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D., Rossier, B.C., 1994. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367, 463–467. <https://doi.org/10.1038/367463a0>
- Caprio, M., Fève, B., Claës, A., Viengchareun, S., Lombès, M., Zennaro, M.-C., 2007. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 2185–2194. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7970com>
- Chakravarthy, S., Sternberg, S.H., Kellenberger, C.A., Doudna, J.A., 2010. Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *J. Mol. Biol.* 404, 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.030>
- Chan, H., Babayan, V., Blyumin, E., Gandhi, C., Hak, K., Harake, D., Kumar, K., Lee, P., Li, T.T., Liu, H.Y., Lo, T.C.T., Meyer, C.J., Stanford, S., Zamora, K.S., Saier, M.H., 2010. The p-type ATPase superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 19, 5–104. <https://doi.org/10.1159/000319588>
- Chandrasekaran, K., Karolina, D.S., Sepramaniam, S., Armugam, A., Wintour, E.M., Bertram, J.F., Jeyaseelan, K., 2012. Role of microRNAs in kidney homeostasis and disease. *Kidney Int.* 81, 617–627. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.448>
- Chatmethakul, T., Roghair, R.D., 2019. Risk of hypertension following perinatal adversity: IUGR and prematurity. *J. Endocrinol.* 242, T21–T32. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0687>
- Chau, B.N., Xin, C., Hartner, J., Ren, S., Castano, A.P., Linn, G., Li, J., Tran, P.T., Kaimal, V., Huang, X., Chang, A.N., Li, S., Kalra, A., Grafals, M., Portilla, D., MacKenna, D.A., Orkin, S.H., Duffield, J.S., 2012. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci. Transl. Med.* 4, 121ra18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003205>
- Chawanpaiboon, S., Vogel, J.P., Moller, A.-B., Lumbiganon, P., Petzold, M., Hogan, D., Landoulsi, S., Jampathong, N., Kongwattanakul, K., Laopaiboon, M., Lewis, C., Rattanakanokchai, S., Teng, D.N., Thinkhamrop, J., Watananirun, K., Zhang, J., Zhou, W., Gülmezoglu, A.M., 2019. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob. Health* 7, e37–e46. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30451-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30451-0)

- Chen, H., Duncan, I.C., Bozorgchami, H., Lo, S.H., 2002. Tensin1 and a previously undocumented family member, tensin2, positively regulate cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 733–738. <https://doi.org/10.1073/pnas.022518699>
- Chen, H.-Y., Zhong, X., Huang, X.R., Meng, X.-M., You, Y., Chung, A.C., Lan, H.Y., 2014. MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 22, 842–853. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.235>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Yujing, Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Yan, Wang, Jin, Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, Juanbin, Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, Jun, Zen, K., Zhang, Junfeng, Zhang, C.-Y., 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.-Y., 2012a. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 22, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.-Y., 2012b. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* 3, 28–37. <https://doi.org/10.1007/s13238-012-2003-z>
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., Shiekhattar, R., 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 823–828. <https://doi.org/10.1038/nature05841>
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature03868>
- Cheng, L., Sharples, R.A., Scicluna, B.J., Hill, A.F., 2014a. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J. Extracell. Vesicles* 3. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23743>
- Cheng, L., Sun, X., Scicluna, B.J., Coleman, B.M., Hill, A.F., 2014b. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int.* 86, 433–444. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.502>
- Cherradi, N., 2015. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Front. Endocrinol.* 6, 195. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00195>
- Cherradi, N., Capponi, A.M., 1998. The acute regulation of mineralocorticoid biosynthesis: scenarios for the StAR system. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 9, 412–418. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(98\)00099-x](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(98)00099-x)

- Cheung, C.Y., Brace, R.A., 2005. Amniotic fluid volume and composition in mouse pregnancy. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12, 558–562. <https://doi.org/10.1016/j.jsigi.2005.08.008>
- Chim, S.S.C., Shing, T.K.F., Hung, E.C.W., Leung, T.-Y., Lau, T.-K., Chiu, R.W.K., Lo, Y.M.D., 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* 54, 482–490. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097972>
- Chow, W.-H., Dong, L.M., Devesa, S.S., 2010. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 7, 245–257. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.46>
- Ciafrè, S.A., Galardi, S., 2013. microRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer. *RNA Biol.* 10, 935–942. <https://doi.org/10.4161/rna.24641>
- Clark, B.J., 2016. ACTH Action on StAR Biology. *Front. Neurosci.* 10, 547. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00547>
- Condon, J.C., Pezzi, V., Drummond, B.M., Yin, S., Rainey, W.E., 2002. Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology* 143, 3651–3657. <https://doi.org/10.1210/en.2001-211359>
- Connell, J.M.C., MacKenzie, S.M., Freel, E.M., Fraser, R., Davies, E., 2008. A lifetime of aldosterone excess: long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function. *Endocr. Rev.* 29, 133–154. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0030>
- Conserva, F., Pontrelli, P., Accetturo, M., Gesualdo, L., 2013. The pathogenesis of diabetic nephropathy: focus on microRNAs and proteomics. *J. Nephrol.* 26, 811–820. <https://doi.org/10.5301/jn.5000262>
- Cook, J., Bennett, P.R., Kim, S.H., Teoh, T.G., Sykes, L., Kindinger, L.M., Garrett, A., Binkhamis, R., MacIntyre, D.A., Terzidou, V., 2019. First Trimester Circulating MicroRNA Biomarkers Predictive of Subsequent Preterm Delivery and Cervical Shortening. *Sci. Rep.* 9, 5861. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42166-1>
- Cordes, K.R., Sheehy, N.T., White, M.P., Berry, E.C., Morton, S.U., Muth, A.N., Lee, T.-H., Miano, J.M., Ivey, K.N., Srivastava, D., 2009. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460, 705–710. <https://doi.org/10.1038/nature08195>
- Coutinho, P., Vega, C., Pojoga, L.H., Rivera, A., Prado, G.N., Yao, T.M., Adler, G., Torres-Grajales, M., Maldonado, E.R., Ramos-Rivera, A., Williams, J.S., Williams, G., Romero, J.R., 2014. Aldosterone's rapid, nongenomic effects are mediated by striatin: a modulator of aldosterone's effect on estrogen action. *Endocrinology* 155, 2233–2243. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1834>

- Dantzler, W.H., Layton, A.T., Layton, H.E., Pannabecker, T.L., 2014. Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* CJASN 9, 1781–1789. <https://doi.org/10.2215/CJN.08750812>
- Daruich, A., Matet, A., Dirani, A., Bousquet, E., Zhao, M., Farman, N., Jaisser, F., Behar-Cohen, F., 2015. Central serous chorioretinopathy: Recent findings and new physiopathology hypothesis. *Prog. Retin. Eye Res.* 48, 82–118. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.05.003>
- de Jong, J.C., Willems, P.H.G.M., van den Heuvel, L.P.W.J., Knoers, N.V.A.M., Bindels, R.J.M., 2003. Functional expression of the human thiazide-sensitive NaCl cotransporter in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* JASN 14, 2428–2435. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000089832.52063.f5>
- de Kloet, E.R., Joëls, M., 2017. Brain mineralocorticoid receptor function in control of salt balance and stress-adaptation. *Physiol. Behav.* 178, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.045>
- Debonneville, C., Flores, S.Y., Kamynina, E., Plant, P.J., Tauxe, C., Thomas, M.A., Münster, C., Chraïbi, A., Pratt, J.H., Horisberger, J.D., Pearce, D., Loffing, J., Staub, O., 2001. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J.* 20, 7052–7059. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7052>
- Dehwah, M.A.S., Xu, A., Huang, Q., 2012. MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 39, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.11.007>
- Denby, L., Ramdas, V., Lu, R., Conway, B.R., Grant, J.S., Dickinson, B., Aurora, A.B., McClure, J.D., Kipgen, D., Delles, C., van Rooij, E., Baker, A.H., 2014. MicroRNA-214 antagonism protects against renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* JASN 25, 65–80. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013010072>
- Desai, M., Guerra, C., Wang, S., Ross, M.G., 2003. Programming of hypertonicity in neonatal lambs: resetting of the threshold for vasopressin secretion. *Endocrinology* 144, 4332–4337. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0200>
- Deshpande, S.D., Putta, S., Wang, M., Lai, J.Y., Bitzer, M., Nelson, R.G., Lanting, L.L., Kato, M., Natarajan, R., 2013. Transforming growth factor- β -induced cross talk between p53 and a microRNA in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes* 62, 3151–3162. <https://doi.org/10.2337/db13-0305>
- Devuyst, O., 2008. Salt wasting and blood pressure. *Nat. Genet.* 40, 495–496. <https://doi.org/10.1038/ng0508-495>
- Diakov, A., Korbmacher, C., 2004. A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *J. Biol. Chem.* 279, 38134–38142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403260200>

- Doench, J.G., Sharp, P.A., 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504–511. <https://doi.org/10.1101/gad.1184404>
- Dojki, F.K., Bakris, G., 2017. Nonsteroidal mineralocorticoid antagonists in diabetic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 26, 368–374. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000340>
- Dooley, R., Angibaud, E., Yusef, Y.R., Thomas, W., Harvey, B.J., 2013. Aldosterone-induced ENaC and basal Na⁺/K⁺-ATPase trafficking via protein kinase D1-phosphatidylinositol 4-kinaseIIIβ trans Golgi signalling in M1 cortical collecting duct cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 372, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.03.011>
- Doucet, A., Katz, A.I., 1981. Mineralocorticoid receptors along the nephron: [3H]aldosterone binding in rabbit tubules. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 241, F605–F611.
- Drake, K.M., Ruteshouser, E.C., Natrajan, R., Harbor, P., Wegert, J., Gessler, M., Pritchard-Jones, K., Grundy, P., Dome, J., Huff, V., Jones, C., Aldred, M.A., 2009. Loss of heterozygosity at 2q37 in sporadic Wilms' tumor: putative role for miR-562. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5985–5992. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1065>
- Draper, N., Stewart, P.M., 2005. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J. Endocrinol.* 186, 251–271. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06019>
- Dressler, G.R., Patel, S.R., 2015. Epigenetics in kidney development and renal disease. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 165, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.04.007>
- Du, B., Ma, L.-M., Huang, M.-B., Zhou, H., Huang, H.-L., Shao, P., Chen, Y.-Q., Qu, L.-H., 2010. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS Lett.* 584, 811–816. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.053>
- Duan, J., Huang, H., Lv, X., Wang, H., Tang, Z., Sun, H., Li, Q., Ai, J., Tan, R., Liu, Y., Chen, M., Duan, W., Wei, Y., Zhou, Q., 2012. PKHD1 post-transcriptionally modulated by miR-365-1 inhibits cell-cell adhesion. *Cell Biochem. Funct.* 30, 382–389. <https://doi.org/10.1002/cbf.2795>
- Duc, C., Farman, N., Canessa, C.M., Bonvalet, J.P., Rossier, B.C., 1994. Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.* 127, 1907–1921. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1907>
- Dumeige, L., Nehlich, M., Viengchareun, S., Perrot, J., Pussard, E., Lombès, M., Martinerie, L., 2020. Preterm birth is associated with epigenetic programming of transgenerational hypertension in mice. *Exp. Mol. Med.* 52, 152–165. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0373-5>
- Duval, D., Funder, J.W., 1974. The binding of tritiated aldosterone in the rat liver cytosol. *Endocrinology* 94, 575–579. <https://doi.org/10.1210/endo-94-2-575>

- Ebert, M.S., Sharp, P.A., 2012. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 149, 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.005>
- Edinger, R.S., Coronello, C., Bodnar, A.J., Labarca, M., Bhalla, V., LaFramboise, W.A., Benos, P.V., Ho, J., Johnson, J.P., Butterworth, M.B., 2014. Aldosterone regulates microRNAs in the cortical collecting duct to alter sodium transport. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 25, 2445–2457. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013090931>
- Edwards, C.R., Stewart, P.M., Burt, D., Brett, L., McIntyre, M.A., Sutanto, W.S., de Kloet, E.R., Monder, C., 1988. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet Lond. Engl.* 2, 986–989. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)90742-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)90742-8)
- Elvira-Matlot, E., Zhou, X., Farman, N., Beaurain, G., Henrion-Caude, A., Hadchouel, J., Jeunemaitre, X., 2010. Regulation of WNK1 Expression by miR-192 and Aldosterone. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1724–1731. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009111186>
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., Sonenberg, N., 2011. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1211–1217. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2149>
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 586–593. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2296>
- Fakitsas, P., Adam, G., Daidié, D., van Bemmelen, M.X., Fouladkou, F., Patrignani, A., Wagner, U., Warth, R., Camargo, S.M.R., Staub, O., Verrey, F., 2007. Early aldosterone-induced gene product regulates the epithelial sodium channel by deubiquitylation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 1084–1092. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006080902>
- Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Haley, L.L., Henry, W.M., Nowak, N.J., Shows, T.B., 1989. The human mineralocorticoid receptor gene (MLR) is located on chromosome 4 at q31.2. *Cytogenet. Cell Genet.* 52, 83–84. <https://doi.org/10.1159/000132846>
- Faresse, N., 2014. Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.015>
- Faresse, N., Debonneville, A., Staub, O., 2013. USP2-45 represses aldosterone mediated responses by decreasing mineralocorticoid receptor availability. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 31, 462–472. <https://doi.org/10.1159/000343382>
- Faresse, N., Ruffieux-Daidie, D., Salamin, M., Gomez-Sanchez, C.E., Staub, O., 2010. Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 299, F1462-1472. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00285.2010>

- Faresse, N., Vitagliano, J.-J., Staub, O., 2012. Differential ubiquitylation of the mineralocorticoid receptor is regulated by phosphorylation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 4373–4382. <https://doi.org/10.1096/fj.12-209924>
- Farman, N., Nguyen, V.T., 2016. A novel actor in skin biology: the mineralocorticoid receptor. *Exp. Dermatol.* 25, 24–25. <https://doi.org/10.1111/exd.12888>
- Farman, N., Rafestin-Oblin, M.-E., 2001. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 280, F181–F192. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.2.F181>
- Féraïlle, E., Doucet, A., 2001. Sodium-Potassium-Adenosinetriphosphatase-Dependent Sodium Transport in the Kidney: Hormonal Control. *Physiol. Rev.* 81, 345–418. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.345>
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>
- Finnegan, E.F., Pasquinelli, A.E., 2013. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 51–68. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.738643>
- Flynt, A.S., Thatcher, E.J., Burkewitz, K., Li, N., Liu, Y., Patton, J.G., 2009. miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos. *J. Cell Biol.* 185, 115–127. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807026>
- Fraccarollo, D., Thomas, S., Scholz, C.-J., Hilfiker-Kleiner, D., Galuppo, P., Bauersachs, J., 2019. Macrophage Mineralocorticoid Receptor Is a Pleiotropic Modulator of Myocardial Infarct Healing. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 73, 102–111. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12162>
- François, H., Chatziantoniou, C., 2018. Renal fibrosis: Recent translational aspects. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 68–69, 318–332. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.013>
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Fukao, A., Aoyama, T., Fujiwara, T., 2015. The molecular mechanism of translational control via the communication between the microRNA pathway and RNA-binding proteins. *RNA Biol.* 12, 922–926. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1073436>
- Fuller, P.J., Yang, J., Young, M.J., 2019. Mechanisms of Mineralocorticoid Receptor Signaling. *Vitam. Horm.* 109, 37–68. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.09.004>
- Fuller, P.J., Yang, J., Young, M.J., 2017. 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Coregulators as mediators of mineralocorticoid receptor signalling diversity. *J. Endocrinol.* 234, T23–T34. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0060>

- Funder, J.W., Pearce, P.T., Smith, R., Smith, A.I., 1988. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242, 583–585. <https://doi.org/10.1126/science.2845584>
- Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F., Williams, B.R.G., 2011. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5692–5703. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr148>
- Garg, A., Foinquinos, A., Jung, M., Janssen-Peters, H., Biss, S., Bauersachs, J., Gupta, S.K., Thum, T., 2020. MiRNA-181a is a novel regulator of aldosterone-mineralocorticoid receptor-mediated cardiac remodelling. *Eur. J. Heart Fail.* <https://doi.org/10.1002/ejhf.1813>
- Garty, H., Palmer, L.G., 1997. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol. Rev.* 77, 359–396. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.2.359>
- Ge, Q., Zhou, Y., Lu, J., Bai, Y., Xie, X., Lu, Z., 2014. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Mol. Basel Switz.* 19, 1568–1575. <https://doi.org/10.3390/molecules19021568>
- Godwin, J.G., Ge, X., Stephan, K., Jurisch, A., Tullius, S.G., Iacomini, J., 2010. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14339–14344. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912701107>
- Goenka, L., Padmanaban, R., George, M., 2019. The Ascent of Mineralocorticoid Receptor Antagonists in Diabetic Nephropathy. *Curr. Clin. Pharmacol.* 14, 78–83. <https://doi.org/10.2174/1574884713666181116100946>
- Gomez, I.G., MacKenna, D.A., Johnson, B.G., Kaimal, V., Roach, A.M., Ren, S., Nakagawa, N., Xin, C., Newitt, R., Pandya, S., Xia, T.-H., Liu, X., Borza, D.-B., Grafals, M., Shankland, S.J., Himmelfarb, J., Portilla, D., Liu, S., Chau, B.N., Duffield, J.S., 2015. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J. Clin. Invest.* 125, 141–156. <https://doi.org/10.1172/JCI75852>
- Gomez-Sanchez, C.E., Warden, M., Gomez-Sanchez, M.T., Hou, X., Gomez-Sanchez, E.P., 2011. Diverse immunostaining patterns of mineralocorticoid receptor monoclonal antibodies. *Steroids* 76, 1541–1545. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.09.004>
- Gong, Y., Renigunta, V., Himmerkus, N., Zhang, J., Renigunta, A., Bleich, M., Hou, J., 2012. Claudin-14 regulates renal Ca⁺⁺ transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J.* 31, 1999–2012. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.49>
- Gougoux, A., 2009. *Physiologie des reins et des liquides corporels, deuxième édition.* ed. Editions MultiMondes.

- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., Enright, A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36, D154–D158. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm952>
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., Bartel, D.P., 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* 27, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>
- Gubhaju, L., Sutherland, M.R., Horne, R.S.C., Medhurst, A., Kent, A.L., Ramsden, A., Moore, L., Singh, G., Hoy, W.E., Black, M.J., 2014. Assessment of renal functional maturation and injury in preterm neonates during the first month of life. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 307, F149-158. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00439.2013>
- Gueutin, V., Deray, G., Isnard-Bagnis, C., 2012. [Renal physiology]. *Bull. Cancer (Paris)* 99, 237–249. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1482>
- Guo, J., Song, W., Boulanger, J., Xu, E.Y., Wang, F., Zhang, Y., He, Q., Wang, S., Yang, L., Pryce, C., Phillips, L., MacKenna, D., Leberer, E., Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., Ding, J., Liu, S., 2019. Dysregulated Expression of microRNA-21 and Disease-Related Genes in Human Patients and in a Mouse Model of Alport Syndrome. *Hum. Gene Ther.* 30, 865–881. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.205>
- Gupta Shashi K., Bang Claudia, Thum Thomas, 2010. Circulating MicroRNAs as Biomarkers and Potential Paracrine Mediators of Cardiovascular Disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 3, 484–488. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958363>
- Ha, M., Kim, V.N., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A., Filipowicz, W., 2005. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 6, 961–967. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400509>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., Kim, V.N., 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887–901. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.043>
- Harvey, S.J., Jarad, G., Cunningham, J., Goldberg, S., Schermer, B., Harfe, B.D., McManus, M.T., Benzing, T., Miner, J.H., 2008. Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19, 2150–2158. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008020233>
- Hashemi, A., Gorji-Bahri, G., 2020. MicroRNA: Promising Roles in Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 21, 1186–1203. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200420101613>
- Haycock, G.B., 1993. The influence of sodium on growth in infancy. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 7, 871–875. <https://doi.org/10.1007/BF01213376>

- Hayes, J., Peruzzi, P.P., Lawler, S., 2014. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.* 20, 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>
- Hellal-Levy, C., Fagart, J., Souque, A., Rafestin-Oblin, M.E., 1999. [Corticosteroid hormones: mechanisms involved in the recognition of aldosterone by mineralocorticoid receptors]. *J. Soc. Biol.* 193, 355–360.
- Helzer, K.T., Hooper, C., Miyamoto, S., Alarid, E.T., 2015. Ubiquitylation of nuclear receptors: new linkages and therapeutic implications. *J. Mol. Endocrinol.* 54, R151-167. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0308>
- Hirasawa, G., Sasano, H., Suzuki, T., Takeyama, J., Muramatu, Y., Fukushima, K., Hiwatashi, N., Toyota, T., Nagura, H., Krozowski, Z.S., 1999. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1453–1458. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.4.5615>
- Ho, J., Kreidberg, J.A., 2013. MicroRNAs in renal development. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 28, 219–225. <https://doi.org/10.1007/s00467-012-2204-y>
- Ho, J., Ng, K.H., Rosen, S., Dostal, A., Gregory, R.I., Kreidberg, J.A., 2008. Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19, 2069–2075. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008020162>
- Ho, J.J.D., Man, J.H.S., Schatz, J.H., Marsden, P.A., 2021. Translational remodeling by RNA-binding proteins and noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* e1647. <https://doi.org/10.1002/wrna.1647>
- Ho, J.J.D., Marsden, P.A., 2014. Competition and collaboration between RNA-binding proteins and microRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 69–86. <https://doi.org/10.1002/wrna.1197>
- Holtbäck, U., Aperia, A.C., 2003. Molecular determinants of sodium and water balance during early human development. *Semin. Neonatol.* SN 8, 291–299. [https://doi.org/10.1016/S1084-2756\(03\)00042-3](https://doi.org/10.1016/S1084-2756(03)00042-3)
- Huang, W., Liu, H., Wang, T., Zhang, T., Kuang, J., Luo, Y., Chung, S.S.M., Yuan, L., Yang, J.Y., 2011. Tonicity-responsive microRNAs contribute to the maximal induction of osmoregulatory transcription factor OREBP in response to high-NaCl hypertonicity. *Nucleic Acids Res.* 39, 475–485. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq818>
- Huang, Y., Wang, Y., Ouyang, Y., 2020. Elevated microRNA-135b-5p relieves neuronal injury and inflammation in post-stroke cognitive impairment by targeting NR3C2. *Int. J. Neurosci.* 0, 1–9. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1802265>
- Huyet, J., Pinon, G.M., Fay, M.R., Rafestin-Oblin, M.-E., Fagart, J., 2012. Structural determinants of ligand binding to the mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 350, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.035>

- Iguchi, H., Kosaka, N., Ochiya, T., 2010. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun. Integr. Biol.* 3, 478–481. <https://doi.org/10.4161/cib.3.5.12693>
- Ishimoto, H., Jaffe, R.B., 2011. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the feto-placental unit. *Endocr. Rev.* 32, 317–355. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0001>
- Jackson, R.J., Standart, N., 2007. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2007, re1. <https://doi.org/10.1126/stke.3672007re1>
- Jacobs, M.E., Kathpalia, P.P., Chen, Y., Thomas, S.V., Noonan, E.J., Pao, A.C., 2016. SGK1 regulation by miR-466g in cortical collecting duct cells. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 310, F1251–F1257. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00024.2016>
- Jaffe, I.Z., Mendelsohn, M.E., 2005. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* 96, 643–650. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000159937.05502.d1>
- Jaglaquier, S., Mesnier, D., Läger, J.L., Auzou, G., 1996. Putative steroid binding domain of the human mineralocorticoid receptor, expressed in *E. coli* in the presence of heat shock proteins shows typical native receptor characteristics. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 57, 43–50. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00250-2](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00250-2)
- Jaisser, F., Farman, N., 2016. Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 68, 49–75. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011106>
- Jens, M., Rajewsky, N., 2015. Competition between target sites of regulators shapes post-transcriptional gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 16, 113–126. <https://doi.org/10.1038/nrg3853>
- Jiang, P., Coller, H., 2012. Functional interactions between microRNAs and RNA binding proteins. *MicroRNA Shariqah United Arab Emir.* 1, 70–79. <https://doi.org/10.2174/2211536611201010070>
- Jiménez-Canino, R., Fernandes, M.X., Alvarez de la Rosa, D., 2016. Phosphorylation of Mineralocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Impairs Receptor Activation and Has a Dominant Negative Effect over Non-phosphorylated Receptors. *J. Biol. Chem.* 291, 19068–19078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718395>
- Jiménez-Panizo, A., Pérez, P., Rojas, A.M., Fuentes-Prior, P., Estébanez-Perpiñá, E., 2019. Non-canonical dimerization of the androgen receptor and other nuclear receptors: implications for human disease. *Endocr. Relat. Cancer* 26, R479–R497. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0132>

- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.-C., Gram, H., Han, J., 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120, 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.038>
- Johnston, Z.C., Bellingham, M., Filis, P., Soffientini, U., Hough, D., Bhattacharya, S., Simard, M., Hammond, G.L., King, P., O’Shaughnessy, P.J., Fowler, P.A., 2018. The human fetal adrenal produces cortisol but no detectable aldosterone throughout the second trimester. *BMC Med.* 16, 23. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1009-7>
- Kanatsou, S., Joels, M., Krugers, H., 2019. Brain Mineralocorticoid Receptors and Resilience to Stress. *Vitam. Horm.* 109, 341–359. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.11.001>
- Kang, K., Liao, X., Li, Q., Chen, J., Niu, Y., Zeng, Y., Xia, S., Zeng, L., Liu, S., Gou, D., 2021. A novel tonicity-responsive microRNA miR-23a-5p modulates renal cell survival under osmotic stress through targeting heat shock protein 70 HSPA1B. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 320, C225–C239. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00441.2020>
- Karpetsky, T.P., Humphrey, R.L., Levy, C.C., 1977. Influence of renal insufficiency on levels of serum ribonuclease in patients with multiple myeloma. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 875–880. <https://doi.org/10.1093/jnci/58.4.875>
- Kato, M., Zhang, J., Wang, M., Lanting, L., Yuan, H., Rossi, J.J., Natarajan, R., 2007. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3432–3437. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611192104>
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A.F., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., Lund, A.H., Perrakis, A., Raz, E., Agami, R., 2007. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131, 1273–1286. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.034>
- Kedde, M., van Kouwenhove, M., Zwart, W., Oude Vrielink, J.A.F., Elkon, R., Agami, R., 2010. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3’ UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. *Nat. Cell Biol.* 12, 1014–1020. <https://doi.org/10.1038/ncb2105>
- Keene, J.D., 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* 8, 533–543. <https://doi.org/10.1038/nrg2111>
- Keller-Wood, M., Wood, C.E., Hua, Y., Zhang, D., 2005. Mineralocorticoid receptor expression in late-gestation ovine fetal lung. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.jsigi.2004.10.010>
- Kenouch, S., Lombes, M., Delahaye, F., Eugene, E., Bonvalet, J.P., Farman, N., 1994. Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-

- hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1334–1341. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.5.7962326>
- Kerscher, O., Felberbaum, R., Hochstrasser, M., 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 159–180. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093503>
- Kiilerich, P., Kristiansen, K., Madsen, S.S., 2007. Hormone receptors in gills of smolting Atlantic salmon, *Salmo salar*: expression of growth hormone, prolactin, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.12.018>
- Kiilerich, P., Triqueneaux, G., Christensen, N.M., Trayer, V., Terrien, X., Lombès, M., Prunet, P., 2015. Interaction between the trout mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in vitro. *J. Mol. Endocrinol.* 55, 55–68. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0002>
- Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., Gorospe, M., 2009. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* 23, 1743–1748. <https://doi.org/10.1101/gad.1812509>
- Kim, V.N., 2004. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* 14, 156–159. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.02.006>
- Knepper, M.A., 1982. Measurement of osmolality in kidney slices using vapor pressure osmometry. *Kidney Int.* 21, 653–655. <https://doi.org/10.1038/ki.1982.73>
- Knoers, N.V.A.M., Levtchenko, E.N., 2008. Gitelman syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 3, 22. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-22>
- Köberle, V., Pleli, T., Schmithals, C., Augusto Alonso, E., Haupenthal, J., Bönig, H., Peveling-Oberhag, J., Biondi, R.M., Zeuzem, S., Kronenberger, B., Waidmann, O., Piiper, A., 2013. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers. *PLoS One* 8, e75184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075184>
- Kolla, V., Robertson, N.M., Litwack, G., 1999. Identification of a mineralocorticoid/glucocorticoid response element in the human Na/K ATPase alpha1 gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 5–14. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1765>
- Kort, E.J., Farber, L., Tretiakova, M., Petillo, D., Furge, K.A., Yang, X.J., Cornelius, A., Teh, B.T., 2008. The E2F3-Oncomir-1 axis is activated in Wilms' tumor. *Cancer Res.* 68, 4034–4038. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0592>
- Koscianska, E., Starega-Roslan, J., Krzyzosiak, W.J., 2011. The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. *PLoS One* 6, e28548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028548>

- Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S., 2019. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 47, D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W., 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Krozowski, Z., Funder, J.W., 1981. Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology* 109, 1811–1813. <https://doi.org/10.1210/endo-109-6-1811>
- Lacour, B., 2013. Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Rev. Francoph. Lab.* 2013, 25–37. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)71993-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)71993-2)
- Lal, C.V., Olave, N., Travers, C., Rezonzew, G., Dolma, K., Simpson, A., Halloran, B., Aghai, Z., Das, P., Sharma, N., Xu, X., Genschmer, K., Russell, D., Szul, T., Yi, N., Blalock, J.E., Gaggar, A., Bhandari, V., Ambalavanan, N., 2018. Exosomal microRNA predicts and protects against severe bronchopulmonary dysplasia in extremely premature infants. *JCI Insight* 3, 93994. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93994>
- Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., Ørum, H., 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198–201. <https://doi.org/10.1126/science.1178178>
- Laulhé, M., Dumeige, L., Vu, T.A., Hani, I., Pussard, E., Lombès, M., Viengchareun, S., Martinerie, L., 2021. Sexual Dimorphism of Corticosteroid Signaling during Kidney Development. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5275. <https://doi.org/10.3390/ijms22105275>
- Le Billan, F., Amazit, L., Bleakley, K., Xue, Q.-Y., Pussard, E., Lhadj, C., Kolkhof, P., Viengchareun, S., Fagart, J., Lombès, M., 2018. Corticosteroid receptors adopt distinct cyclical transcriptional signatures. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 5626–5639. <https://doi.org/10.1096/fj.201800391RR>
- Le Billan, F., Khan, J.A., Lamribet, K., Viengchareun, S., Bouligand, J., Fagart, J., Lombès, M., 2015. Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 3977–3989. <https://doi.org/10.1096/fj.15-274266>
- Le Billan, F., Perrot, J., Carceller, E., Travers, S., Viengchareun, S., Kolkhof, P., Lombès, M., Fagart, J., 2021. Antagonistic effects of finerenone and spironolactone on the aldosterone-regulated transcriptome of human kidney cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 35, e21314. <https://doi.org/10.1096/fj.202002043RR>
- Le Menuet, D., Isnard, R., Bichara, M., Viengchareun, S., Muffat-Joly, M., Walker, F., Zennaro, M.C., Lombès, M., 2001. Alteration of cardiac and renal functions in transgenic mice overexpressing human mineralocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 38911–38920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103984200>

- Le Menuet, D., Viengchareun, S., Penfornis, P., Walker, F., Zennaro, M.C., Lombès, M., 2000. Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275, 7878–7886. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.7878>
- Le Moëllic, C., Ouvrard-Pascaud, A., Capurro, C., Cluzeaud, F., Fay, M., Jaisser, F., Farman, N., Blot-Chaubaud, M., 2004. Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC α activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15, 1145–1160.
- Lebedeva, S., Jens, M., Theil, K., Schwanhäusser, B., Selbach, M., Landthaler, M., Rajewsky, N., 2011. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell* 43, 340–352. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.008>
- Lee, H.-A., Lee, D.-Y., Cho, H.-M., Kim, S.-Y., Iwasaki, Y., Kim, I.K., 2013. Histone deacetylase inhibition attenuates transcriptional activity of mineralocorticoid receptor through its acetylation and prevents development of hypertension. *Circ. Res.* 112, 1004–1012. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301071>
- Lee, J.H., Lee, M.J., 2012. Emerging roles of the ubiquitin-proteasome system in the steroid receptor signaling. *Arch. Pharm. Res.* 35, 397–407. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0301-x>
- Lee, S.H., Yoo, T.-H., Nam, B.-Y., Kim, D.K., Li, J.J., Jung, D.-S., Kwak, S.-J., Ryu, D.-R., Han, S.H., Lee, J.E., Moon, S.J., Han, D.S., Kang, S.-W., 2009. Activation of local aldosterone system within podocytes is involved in apoptosis under diabetic conditions. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297, F1381-1390. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00101.2009>
- Lee, S.-O., Masyuk, T., Splinter, P., Banales, J.M., Masyuk, A., Stroope, A., Larusso, N., 2008. MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator Cdc25A and affects hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease. *J. Clin. Invest.* 118, 3714–3724. <https://doi.org/10.1172/JCI34922>
- Lefebvre, H., Duparc, C., Naccache, A., Lopez, A.-G., Castanet, M., Louiset, E., 2019. Paracrine Regulation of Aldosterone Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. *Vitam. Horm.* 109, 303–339. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.10.001>
- Leibovich, L., Mandel-Gutfreund, Y., Yakhini, Z., 2010. A structural-based statistical approach suggests a cooperative activity of PUM1 and miR-410 in human 3'-untranslated regions. *Silence* 1, 17. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-17>
- Lema, I., Amazit, L., Lamribet, K., Fagart, J., Blanchard, A., Lombès, M., Cherradi, N., Viengchareun, S., 2017a. RNA-binding protein HuR enhances mineralocorticoid signaling in renal KC3AC1 cells under hypotonicity. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 4587–4597. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2594-x>

- Lema, I., Amazit, L., Lamribet, K., Fagart, J., Blanchard, A., Lombès, M., Cherradi, N., Viengchareun, S., 2017b. HuR-Dependent Editing of a New Mineralocorticoid Receptor Splice Variant Reveals an Osmoregulatory Loop for Sodium Homeostasis. *Sci. Rep.* 7, 4835. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04838-8>
- Leroy, V., De Seigneux, S., Agassiz, V., Hasler, U., Rafestin-Oblin, M.-E., Vinciguerra, M., Martin, P.-Y., Féraïlle, E., 2009. Aldosterone activates NF-kappaB in the collecting duct. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 131–144. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008020232>
- Li, R., Chung, A.C.K., Dong, Y., Yang, W., Zhong, X., Lan, H.Y., 2013. The microRNA miR-433 promotes renal fibrosis by amplifying the TGF- β /Smad3-Azin1 pathway. *Kidney Int.* 84, 1129–1144. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.272>
- Li, S.-Y., Song, Z., Yan, Y.-P., Li, B., Song, M.-J., Liu, Y.-F., Yang, Z.-S., Li, M.-Y., Liu, A.-X., Quan, S., Yang, Z.-M., 2020. Aldosterone from endometrial glands is benefit for human decidualization. *Cell Death Dis.* 11, 679. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02844-9>
- Liang, X., Butterworth, M.B., Peters, K.W., Frizzell, R.A., 2010. AS160 modulates aldosterone-stimulated epithelial sodium channel forward trafficking. *Mol. Biol. Cell* 21, 2024–2033. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-01-0042>
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773. <https://doi.org/10.1038/nature03315>
- Lin, D.-H., Yue, P., Pan, C., Sun, P., Wang, W.-H., 2011. MicroRNA 802 stimulates ROMK channels by suppressing caveolin-1. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 1087–1098. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010090927>
- Lin, D.-H., Yue, P., Zhang, C., Wang, W.-H., 2014. MicroRNA-194 (miR-194) regulates ROMK channel activity by targeting intersectin 1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 306, F53-60. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00349.2013>
- Lindower, J.B., 2017. Water balance in the fetus and neonate. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 22, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2017.01.002>
- Liu, X., Edinger, R.S., Klemens, C.A., Phua, Y.L., Bodnar, A.J., LaFramboise, W.A., Ho, J., Butterworth, M.B., 2017. A MicroRNA Cluster miR-23-24-27 Is Upregulated by Aldosterone in the Distal Kidney Nephron Where it Alters Sodium Transport. *J. Cell. Physiol.* 232, 1306–1317. <https://doi.org/10.1002/jcp.25599>
- Liu, Y., Chen, Xiaorui, Cheng, R., Yang, F., Yu, M., Wang, C., Cui, S., Hong, Y., Liang, H., Liu, M., Zhao, C., Ding, M., Sun, W., Liu, Z., Sun, F., Zhang, C., Zhou, Z., Jiang, X., Chen, Xi, 2018. The Jun/miR-22/HuR regulatory axis contributes to tumorigenesis in colorectal cancer. *Mol. Cancer* 17, 11. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0751-3>

- Liu, Y., Yin, B., Zhang, C., Zhou, L., Fan, J., 2012. Hsa-let-7a functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma cell lines by targeting c-myc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 371–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.119>
- Loffing, J., Schild, L., 2005. Functional domains of the epithelial sodium channel. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16, 3175–3181. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005050456>
- Lombès, M., Binart, N., Oblin, M.E., Joulin, V., Baulieu, E.E., 1993. Characterization of the interaction of the human mineralocorticosteroid receptor with hormone response elements. *Biochem. J.* 292 (Pt 2), 577–583. <https://doi.org/10.1042/bj2920577>
- Lombes, M., Farman, N., Oblin, M.E., Baulieu, E.E., Bonvalet, J.P., Erlanger, B.F., Gasc, J.M., 1990. Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 1086–1088.
- Lombes, M., Kenouch, S., Souque, A., Farman, N., Rafestin-Oblin, M.E., 1994. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 135, 834–840. <https://doi.org/10.1210/endo.135.3.8070376>
- Lombès, M., Oblin, M.E., Gasc, J.M., Baulieu, E.E., Farman, N., Bonvalet, J.P., 1992. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ. Res.* 71, 503–510. <https://doi.org/10.1161/01.res.71.3.503>
- Long, D., Lee, R., Williams, P., Chan, C.Y., Ambros, V., Ding, Y., 2007. Potent effect of target structure on microRNA function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 287–294. <https://doi.org/10.1038/nsmb1226>
- Long, J., Wang, Y., Wang, W., Chang, B.H.J., Danesh, F.R., 2011. MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* 286, 11837–11848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194969>
- Lorenzen, J., Kumarswamy, R., Dangwal, S., Thum, T., 2012. MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications. *RNA Biol.* 9, 820–827. <https://doi.org/10.4161/rna.20162>
- Lorenzen, J.M., Haller, H., Thum, T., 2011. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 7, 286–294. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.26>
- Lorenzen, J.M., Thum, T., 2012. Circulating and urinary microRNAs in kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 7, 1528–1533. <https://doi.org/10.2215/CJN.01170212>
- Lou, Y., Zhang, F., Luo, Y., Wang, L., Huang, S., Jin, F., 2016. Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase 1 in Sodium Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17081307>
- Lu, T.X., Rothenberg, M.E., 2018. MicroRNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>

- Luo, J.-Q., Wang, L.-Y., He, F.-Z., Sun, N.-L., Tang, G.-F., Wen, J.-G., Luo, Z.-Y., Liu, Z.-Q., Zhou, H.-H., Chen, X.-P., Zhang, W., 2014. Effect of NR3C2 genetic polymorphisms on the blood pressure response to enalapril treatment. *Pharmacogenomics* 15, 201–208. <https://doi.org/10.2217/pgs.13.173>
- Luo, Y., Liu, Y., Liu, M., Wei, J., Zhang, Y., Hou, J., Huang, W., Wang, T., Li, X., He, Y., Ding, F., Yuan, L., Cai, J., Zheng, F., Yang, J.Y., 2014. Sfmt2 10th intron-hosted miR-466(a/e)-3p are important epigenetic regulators of Nfat5 signaling, osmoregulation and urine concentration in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.12.005>
- Lv, L.-L., Cao, Y., Liu, D., Xu, M., Liu, H., Tang, R.-N., Ma, K.-L., Liu, B.-C., 2013. Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1021–1031. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6100>
- Ma, L., Qu, L., 2013. The function of microRNAs in renal development and pathophysiology. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* 40, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.03.002>
- MacKenzie, S.M., van Kralingen, J.C., Davies, E., 2019. Regulation of Aldosterone Secretion. *Vitam. Horm.* 109, 241–263. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.07.001>
- Maeda, M., Hamano, K., Hirano, Y., Suzuki, M., Takahashi, E., Terada, T., Futai, M., Sato, R., 1998. Structures of P-type transporting ATPases and chromosomal locations of their genes. *Cell Struct. Funct.* 23, 315–323. <https://doi.org/10.1247/csf.23.315>
- Mall, C., Rocke, D.M., Durbin-Johnson, B., Weiss, R.H., 2013. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomark. Med.* 7, 623–631. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.44>
- Mannironi, C., Camon, J., De Vito, F., Biundo, A., De Stefano, M.E., Persiconi, I., Bozzoni, I., Fragapane, P., Mele, A., Presutti, C., 2013. Acute stress alters amygdala microRNA miR-135a and miR-124 expression: inferences for corticosteroid dependent stress response. *PloS One* 8, e73385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073385>
- Maroney, P.A., Yu, Y., Nilsen, T.W., 2006. MicroRNAs, mRNAs, and translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 531–535. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.043>
- Marrone, A.K., Ho, J., 2014. MicroRNAs: potential regulators of renal development genes that contribute to CAKUT. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 29, 565–574. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2599-0>
- Martinerie, L., Munier, M., Le Menuet, D., Meduri, G., Viengchareun, S., Lombès, M., 2013. The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie* 95, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.030>

- Martinerie, L., Pussard, E., Foix-L'Hélias, L., Petit, F., Cosson, C., Boileau, P., Lombès, M., 2009a. Physiological partial aldosterone resistance in human newborns. *Pediatr. Res.* 66, 323–328. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181b1bbec>
- Martinerie, L., Pussard, E., Yousef, N., Cosson, C., Lema, I., Husseini, K., Mur, S., Lombès, M., Boileau, P., 2015. Aldosterone-Signaling Defect Exacerbates Sodium Wasting in Very Preterm Neonates: The Premaldo Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 4074–4081. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2272>
- Martinerie, L., Viengchareun, S., Delezoide, A.-L., Jaubert, F., Sinico, M., Prevot, S., Boileau, P., Meduri, G., Lombès, M., 2009b. Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* 150, 4414–4424. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1498>
- Martinerie, L., Viengchareun, S., Meduri, G., Kim, H.-S., Luther, J.M., Lombès, M., 2011. Aldosterone postnatally, but not at birth, is required for optimal induction of renal mineralocorticoid receptor expression and sodium reabsorption. *Endocrinology* 152, 2483–2491. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1460>
- Marver, D., Stewart, J., Funder, J.W., Feldman, D., Edelman, I.S., 1974. Renal aldosterone receptors: studies with (3H)aldosterone and the anti-mineralocorticoid (3H)spiro lactone (SC-26304). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1431–1435. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1431>
- Marzi, M.J., Ghini, F., Cerruti, B., de Pretis, S., Bonetti, P., Giacomelli, C., Gorski, M.M., Kress, T., Pelizzola, M., Muller, H., Amati, B., Nicassio, F., 2016. Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. *Genome Res.* 26, 554–565. <https://doi.org/10.1101/gr.198788.115>
- Masilamani, S., Kim, G.H., Mitchell, C., Wade, J.B., Knepper, M.A., 1999. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J. Clin. Invest.* 104, R19–23. <https://doi.org/10.1172/JCI7840>
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., Filipowicz, W., Duchaine, T.F., Sonenberg, N., 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1146067>
- McEaney, V., Harvey, B.J., Thomas, W., 2008. Aldosterone regulates rapid trafficking of epithelial sodium channel subunits in renal cortical collecting duct cells via protein kinase D activation. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 881–892. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0225>
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., Tuschl, T., 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>

- Melau, C., Nielsen, J.E., Frederiksen, H., Kilcoyne, K., Perlman, S., Lundvall, L., Langhoff Thuesen, L., Juul Hare, K., Andersson, A.-M., Mitchell, R.T., Juul, A., Jørgensen, A., 2019. Characterization of Human Adrenal Steroidogenesis During Fetal Development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 1802–1812. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01759>
- Melchior, F., 2000. SUMO—Nonclassical Ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 591–626. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.591>
- Mészáros, K., Pruess, L., Szabó, A.J., Gondan, M., Ritz, E., Schaefer, F., 2014. Development of the circadian clockwork in the kidney. *Kidney Int.* 86, 915–922. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.199>
- Mihailidou, A.S., Tzakos, A.G., Ashton, A.W., 2019. Non-Genomic Effects of Aldosterone. *Vitam. Horm.* 109, 133–149. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.12.001>
- Miller, W.L., 2017. Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 28, 771–793. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.09.002>
- Miller, W.L., Auchus, R.J., 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* 32, 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Miranda, K.C., Bond, D.T., McKee, M., Skog, J., Păunescu, T.G., Da Silva, N., Brown, D., Russo, L.M., 2010. Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int.* 78, 191–199. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.106>
- Mirshahi, M., Mirshahi, A., Sedighian, R., Hecquet, C., Faure, J.P., Agarwal, M.K., 1997. Immunochemical demonstration of the mineralocorticoid receptor in ocular tissues. *Neuroendocrinology* 65, 70–78. <https://doi.org/10.1159/000127166>
- Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Abbott, A.L., Lau, N.C., Hellman, A.B., McGonagle, S.M., Bartel, D.P., Ambros, V.R., Horvitz, H.R., 2007. Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genet.* 3, e215. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030215>
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Mladinov, D., Liu, Y., Mattson, D.L., Liang, M., 2013. MicroRNAs contribute to the maintenance of cell-type-specific physiological characteristics: miR-192 targets Na⁺/K⁺-ATPase β 1. *Nucleic Acids Res.* 41, 1273–1283. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1228>

- Morales, S., Monzo, M., Navarro, A., 2017. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomol. Concepts* 8, 203–212. <https://doi.org/10.1515/bmc-2017-0024>
- Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., Proudfoot, N.J., 2008. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 902–909. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1475>
- Morozova, N., Zinovyev, A., Nonne, N., Pritchard, L.-L., Gorban, A.N., Harel-Bellan, A., 2012. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA N. Y. N* 18, 1635–1655. <https://doi.org/10.1261/rna.032284.112>
- Morrison, N., Harrap, S.B., Arriza, J.L., Boyd, E., Connor, J.M., 1990. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum. Genet.* 85, 130–132. <https://doi.org/10.1007/BF00276340>
- Mount, D.B., 2014. Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 9, 1974–1986. <https://doi.org/10.2215/CJN.04480413>
- Mraz, M., Malinova, K., Mayer, J., Pospisilova, S., 2009. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.061>
- Mukhadi, S., Hull, R., Mbita, Z., Dlamini, Z., 2015. The Role of MicroRNAs in Kidney Disease. *Non-Coding RNA* 1, 192–221. <https://doi.org/10.3390/ncrna1030192>
- Munier, M., Meduri, G., Viengchareun, S., Leclerc, P., Le Menuet, D., Lombès, M., 2010. Regulation of mineralocorticoid receptor expression during neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Endocrinology* 151, 2244–2254. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0753>
- Naccache, A., Louiset, E., Duparc, C., Laquerrière, A., Patrier, S., Renouf, S., Gomez-Sanchez, C.E., Mukai, K., Lefebvre, H., Castanet, M., 2016. Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 434, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.015>
- Nakada, C., Matsuura, K., Tsukamoto, Y., Tanigawa, M., Yoshimoto, T., Narimatsu, T., Nguyen, L.T., Hijiya, N., Uchida, T., Sato, F., Mimata, H., Seto, M., Moriyama, M., 2008. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *J. Pathol.* 216, 418–427. <https://doi.org/10.1002/path.2437>
- Nakada, C., Tsukamoto, Y., Matsuura, K., Nguyen, T.L., Hijiya, N., Uchida, T., Sato, F., Mimata, H., Seto, M., Moriyama, M., 2011. Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 α , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *J. Pathol.* 224, 280–288. <https://doi.org/10.1002/path.2860>

- Náray-Fejes-Tóth, A., Canessa, C., Cleaveland, E.S., Aldrich, G., Fejes-Tóth, G., 1999. SGK is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 274, 16973–16978. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16973>
- Náray-Fejes-Tóth, A., Snyder, P.M., Fejes-Tóth, G., 2004. The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17434–17439. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408146101>
- Navaneethan, S.D., Zoungas, S., Caramori, M.L., Chan, J.C.N., Heerspink, H.J.L., Hurst, C., Liew, A., Michos, E.D., Olowu, W.A., Sadusky, T., Tandon, N., Tuttle, K.R., Wanner, C., Wilkens, K.G., Lytvyn, L., Craig, J.C., Tunnicliffe, D.J., Howell, M., Tonelli, M., Cheung, M., Earley, A., Rossing, P., de Boer, I.H., Khunti, K., 2021. Diabetes Management in Chronic Kidney Disease: Synopsis of the 2020 KDIGO Clinical Practice Guideline. *Ann. Intern. Med.* 174, 385–394. <https://doi.org/10.7326/M20-5938>
- Nawata, C.M., Pannabecker, T.L., 2018. Mammalian urine concentration: a review of renal medullary architecture and membrane transporters. *J. Comp. Physiol. [B]* 188, 899–918. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1164-3>
- Neal, C.S., Michael, M.Z., Pimlott, L.K., Yong, T.Y., Li, J.Y.Z., Gleadle, J.M., 2011. Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 26, 3794–3802. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr485>
- Negri, A.L., 2015. Role of claudins in renal calcium handling. *Nefrol. Publicacion Of. Soc. Espanola Nefrol.* 35, 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2015.06.011>
- Nguyen, T.T., Brenu, E.W., Staines, D.R., Marshall-Gradisnik, S.M., 2014. MicroRNAs in the intracellular space, regulation of organelle specific pathways in health and disease. *MicroRNA Shariqah United Arab Emir.* 3, 98–107. <https://doi.org/10.2174/2211536604666141218154252>
- Nielsen, S., Smith, B.L., Christensen, E.I., Knepper, M.A., Agre, P., 1993. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell Biol.* 120, 371–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.2.371>
- Nishi, M., Kawata, M., 2007. Dynamics of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor: implications from live cell imaging studies. *Neuroendocrinology* 85, 186–192. <https://doi.org/10.1159/000101917>
- Nishiyama, A., 2019. Pathophysiological mechanisms of mineralocorticoid receptor-dependent cardiovascular and chronic kidney disease. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 42, 293–300. <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0158-6>
- Nishiyama, A., Yao, L., Fan, Y., Kyaw, M., Kataoka, N., Hashimoto, K., Nagai, Y., Nakamura, E., Yoshizumi, M., Shokoji, T., Kimura, S., Kiyomoto, H., Tsujioka, K., Kohno, M., Tamaki, T., Kajiya, F., Abe, Y., 2005. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell

- proliferation and deformability. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 45, 710–716.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000154681.38944.9a>
- Nossent, A.Y., Hansen, J.L., Doggen, C., Quax, P.H.A., Sheikh, S.P., Rosendaal, F.R., 2011. SNPs in microRNA binding sites in 3'-UTRs of RAAS genes influence arterial blood pressure and risk of myocardial infarction. *Am. J. Hypertens.* 24, 999–1006. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.92>
- Nottrott, S., Simard, M.J., Richter, J.D., 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1108–1114.
<https://doi.org/10.1038/nsmb1173>
- Ocello, A., La Rosa, S., Fiorini, F., Randone, S., Maccarrone, R., Battaglia, G., Granata, A., 2019. [Antifibrotic renal role of mineralocorticoid receptor antagonists]. *G. Ital. Nefrol. Organo Uff. Della Soc. Ital. Nefrol.* 36.
- Olena, A.F., Patton, J.G., 2010. Genomic Organization of microRNAs. *J. Cell. Physiol.* 222, 540.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21993>
- Ørom, U.A., Nielsen, F.C., Lund, A.H., 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 30, 460–471.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>
- Ortiz-Quintero, B., 2016. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Prolif.* 49, 281–303. <https://doi.org/10.1111/cpr.12262>
- Osella, M., Bosia, C., Corá, D., Caselle, M., 2011. The Role of Incoherent MicroRNA-Mediated Feedforward Loops in Noise Buffering. *PLoS Comput. Biol.* 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001101>
- Ozbaki-Yagan, N., Liu, X., Bodnar, A.J., Ho, J., Butterworth, M.B., 2020. Aldosterone-induced microRNAs act as feedback regulators of mineralocorticoid receptor signaling in kidney epithelia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* <https://doi.org/10.1096/fj.201902254RR>
- Palmer, L.G., Schnermann, J., 2015. Integrated control of Na transport along the nephron. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 10, 676–687. <https://doi.org/10.2215/CJN.12391213>
- Pan, J., Zhang, J., Zhang, X., Zhou, X., Lu, S., Huang, X., Shao, J., Lou, G., Yang, D., Geng, Y.-J., 2014. Role of microRNA-29b in angiotensin II-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 34, 1381–1387. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1935>
- Papadopoulos, T., Belliere, J., Bascands, J.-L., Neau, E., Klein, J., Schanstra, J.P., 2015. miRNAs in urine: a mirror image of kidney disease? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15, 361–374.
<https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1009449>
- Parkinson, J.R.C., Hyde, M.J., Gale, C., Santhakumaran, S., Modi, N., 2013. Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics* 131, e1240-1263. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-2177>

- Pascual-Le Tallec, L., Demange, C., Lombès, M., 2004. Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities. *Eur. J. Endocrinol.* 150, 585–590. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1500585>
- Pascual-Le Tallec, L., Lombès, M., 2005. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 2211–2221. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0089>
- Pascual-Le Tallec, L., Simone, F., Viengchareun, S., Meduri, G., Thirman, M.J., Lombès, M., 2005. The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 1158–1169. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0331>
- Pasquinelli, A.E., 2012. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* 13, 271–282. <https://doi.org/10.1038/nrg3162>
- Pastorelli, L.M., Wells, S., Fray, M., Smith, A., Hough, T., Harfe, B.D., McManus, M.T., Smith, L., Woolf, A.S., Cheeseman, M., Greenfield, A., 2009. Genetic analyses reveal a requirement for Dicer1 in the mouse urogenital tract. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 20, 140–151. <https://doi.org/10.1007/s00335-008-9169-y>
- Payne, J.A., Forbush, B., 1995. Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 493–503. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80005-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80005-0)
- Pearce, D., 2001. The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 12, 341–347. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(01\)00439-8](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00439-8)
- Pedram, A., Razandi, M., Aitkenhead, M., Hughes, C.C.W., Levin, E.R., 2002. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J. Biol. Chem.* 277, 50768–50775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210106200>
- Pedrosa, A.L., Bitencourt, L., Paranhos, R.M., Leitão, C.A., Ferreira, G.C., Simões E Silva, A.C., 2021. Alport Syndrome: a comprehensive review on genetics, pathophysiology, histology, clinical, and therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* <https://doi.org/10.2174/0929867328666210108113500>
- Pépin, A., Biola-Vidamment, A., Latré de Laté, P., Espinasse, M.-A., Godot, V., Pallardy, M., 2015. [TSC-22D proteins: new regulators of cell homeostasis?]. *Med. Sci. MS* 31, 75–83. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153101016>
- Piletič, K., Kunej, T., 2016. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch. Toxicol.* 90, 2405–2419. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1815-7>

- Pitovski, D.Z., Drescher, M.J., Kerr, T.P., Drescher, D.G., 1993. Aldosterone mediates an increase in [3H]ouabain binding at Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase sites in the mammalian inner ear. *Brain Res.* 601, 273–278. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91720-d](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91720-d)
- Pooley, J.R., Rivers, C.A., Kilcooley, M.T., Paul, S.N., Cavga, A.D., Kershaw, Y.M., Muratcioglu, S., Gursoy, A., Keskin, O., Lightman, S.L., 2020. Beyond the heterodimer model for mineralocorticoid and glucocorticoid receptor interactions in nuclei and at DNA. *PloS One* 15, e0227520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227520>
- Pressley, L., Funder, J.W., 1975. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in gut mucosa. *Endocrinology* 97, 588–596. <https://doi.org/10.1210/endo-97-3-588>
- Purkerson, J.M., Schwartz, G.J., 2007. The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney Int.* 71, 103–115. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002020>
- Putta, S., Lanting, L., Sun, G., Lawson, G., Kato, M., Natarajan, R., 2012. Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23, 458–469. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011050485>
- Qin, W., Chung, A.C.K., Huang, X.R., Meng, X.-M., Hui, D.S.C., Yu, C.-M., Sung, J.J.Y., Lan, H.Y., 2011. TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 1462–1474. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010121308>
- Quinkler, M., Zehnder, D., Eardley, K.S., Lepenies, J., Howie, A.J., Hughes, S.V., Cockwell, P., Hewison, M., Stewart, P.M., 2005. Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria. *Circulation* 112, 1435–1443. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.539122>
- Rafestin-Oblin, M.E., Lombes, M., Michiel, J.B., Michaud, A., Claire, M., 1984. Mineralocorticoid receptors in the epithelial cells of human colon and ileum. *J. Steroid Biochem.* 20, 311–315. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(84\)90223-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(84)90223-1)
- Rahman, M.L., Liang, L., Valeri, L., Su, L., Zhu, Z., Gao, S., Mostofa, G., Qamruzzaman, Q., Hauser, R., Baccarelli, A., Christiani, D.C., 2018. Regulation of birthweight by placenta-derived miRNAs: evidence from an arsenic-exposed birth cohort in Bangladesh. *Epigenetics* 13, 573–590. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1481704>
- Raikwar, N.S., Thomas, C.P., 2017. Aldosterone regulates a 5' variant sgk1 transcript via a shared hormone response element in the sgk1 5' regulatory region. *Physiol. Rep.* 5. <https://doi.org/10.14814/phy2.13221>
- Rashmi, P., Colussi, G., Ng, M., Wu, X., Kidwai, A., Pearce, D., 2017. Glucocorticoid-induced leucine zipper protein regulates sodium and potassium balance in the distal nephron. *Kidney Int.* 91, 1159–1177. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.10.038>

- Rickard, A.J., Morgan, J., Tesch, G., Funder, J.W., Fuller, P.J., Young, M.J., 2009. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 54, 537–543. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.131110>
- Rivers, C.A., Rogers, M.F., Stubbs, F.E., Conway-Campbell, B.L., Lightman, S.L., Pooley, J.R., 2019. Glucocorticoid Receptor-Tethered Mineralocorticoid Receptors Increase Glucocorticoid-Induced Transcriptional Responses. *Endocrinology* 160, 1044–1056. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00819>
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14, 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>
- Rogerson, F.M., Dimopoulos, N., Sluka, P., Chu, S., Curtis, A.J., Fuller, P.J., 1999. Structural determinants of aldosterone binding selectivity in the mineralocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 36305–36311. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36305>
- Rogerson, F.M., Yao, Y.-Z., Young, M.J., Fuller, P.J., 2014. Identification and characterization of a ligand-selective mineralocorticoid receptor coactivator. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 4200–4210. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242479>
- Rossier, B.C., Pradervand, S., Schild, L., Hummler, E., 2002. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 877–897. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.082101.143243>
- Rossier, B.C., Staub, O., Hummler, E., 2013. Genetic dissection of sodium and potassium transport along the aldosterone-sensitive distal nephron: Importance in the control of blood pressure and hypertension. *FEBS Lett.* 587, 1929–1941. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.013>
- Rotin, D., 2000. Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by accessory proteins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 9, 529–534. <https://doi.org/10.1097/00041552-200009000-00012>
- Roy, A., Al-Qusairi, L., Donnelly, B.F., Ronzaud, C., Marciszyn, A.L., Gong, F., Chang, Y.P.C., Butterworth, M.B., Pastor-Soler, N.M., Hallows, K.R., Staub, O., Subramanya, A.R., 2015. Alternatively spliced proline-rich cassettes link WNK1 to aldosterone action. *J. Clin. Invest.* 125, 3433–3448. <https://doi.org/10.1172/JCI75245>
- Rüegger, S., Großhans, H., 2012. MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem. Sci.* 37, 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.07.002>
- Ruhs, S., Nolze, A., Hübschmann, R., Grossmann, C., 2017. 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Nongenomic effects via the mineralocorticoid receptor. *J. Endocrinol.* 234, T107–T124. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0659>

- Rupaimoole, R., Slack, F.J., 2017. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 203–222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Saint-Faust, M., Boubred, F., Simeoni, U., 2014. Renal development and neonatal adaptation. *Am. J. Perinatol.* 31, 773–780. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361831>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H.R., Soleymani Fard, S., Ghaffari, S.H., 2019. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J. Cell. Physiol.* 234, 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Salmanidis, M., Pillman, K., Goodall, G., Bracken, C., 2014. Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 54, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.010>
- Sanz-Rubio, D., Martin-Burriel, I., Gil, A., Cubero, P., Forner, M., Khalyfa, A., Marin, J.M., 2018. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects. *Sci. Rep.* 8, 10306. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28748-5>
- Sasano, H., Fukushima, K., Sasaki, I., Matsuno, S., Nagura, H., Krozowski, Z.S., 1992. Immunolocalization of mineralocorticoid receptor in human kidney, pancreas, salivary, mammary and sweat glands: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *J. Endocrinol.* 132, 305–310. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1320305>
- Schena, F.P., Serino, G., Sallustio, F., 2014. MicroRNAs in kidney diseases: new promising biomarkers for diagnosis and monitoring. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 29, 755–763. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft223>
- Schnall-Levin, M., Zhao, Y., Perrimon, N., Berger, B., 2010. Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15751–15756. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006172107>
- Schreier, B., Wolf, A., Hammer, S., Pohl, S., Mildenerger, S., Rabe, S., Gekle, M., Zipprich, A., 2018. The selective mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone prevents decompensation of the liver in cirrhosis. *Br. J. Pharmacol.* 175, 2956–2967. <https://doi.org/10.1111/bph.14341>
- Segar, J.L., 2020. A physiological approach to fluid and electrolyte management of the preterm infant: Review. *J. Neonatal-Perinat. Med.* 13, 11–19. <https://doi.org/10.3233/NPM-190309>
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., Rajewsky, N., 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
- Senanayake, U., Das, S., Vesely, P., Alzoughbi, W., Fröhlich, L.F., Chowdhury, P., Leuschner, I., Hoefler, G., Guertl, B., 2012. miR-192, miR-194, miR-215, miR-200c and miR-141 are downregulated

- and their common target ACVR2B is strongly expressed in renal childhood neoplasms. *Carcinogenesis* 33, 1014–1021. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs126>
- Sentilhes, L., Sénat, M.-V., Ancel, P.-Y., Azria, E., Benoist, G., Blanc, J., Brabant, G., Bretelle, F., Brun, S., Doret, M., Ducroux-Schouwey, C., Evrard, A., Kayem, G., Maisonneuve, E., Marcellin, L., Marret, S., Mottet, N., Paysant, S., Riethmuller, D., Rozenberg, P., Schmitz, T., Torchin, H., Langer, B., 2016. [Prevention of spontaneous preterm birth (excluding preterm premature rupture of membranes): Guidelines for clinical practice - Text of the Guidelines (short text)]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 45, 1446–1456. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2016.09.011>
- Sequeira-Lopez, M.L.S., Weatherford, E.T., Borges, G.R., Monteagudo, M.C., Pentz, E.S., Harfe, B.D., Carretero, O., Sigmund, C.D., Gomez, R.A., 2010. The microRNA-processing enzyme dicer maintains juxtaglomerular cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21, 460–467. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009090964>
- Sethi, P., Lukiw, W.J., 2009. Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci. Lett.* 459, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.052>
- Sevilla, L.M., Pérez, P., 2018. Roles of the Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors in Skin Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19071906>
- Shi, H., Asher, C., Chigaev, A., Yung, Y., Reuveny, E., Seger, R., Garty, H., 2002. Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277, 13539–13547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111717200>
- Shi, S., Yu, L., Chiu, C., Sun, Y., Chen, J., Khitrov, G., Merckenschlager, M., Holzman, L.B., Zhang, W., Mundel, P., Bottinger, E.P., 2008. Podocyte-selective deletion of dicer induces proteinuria and glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19, 2159–2169. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008030312>
- Shibata, H., Itoh, H., 2012. Mineralocorticoid receptor-associated hypertension and its organ damage: clinical relevance for resistant hypertension. *Am. J. Hypertens.* 25, 514–523. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.245>
- Shibata, S., Nagase, M., Yoshida, S., Kawachi, H., Fujita, T., 2007. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 49, 355–364. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000255636.11931.a2>
- Shibata, S., Rinehart, J., Zhang, J., Moeckel, G., Castañeda-Bueno, M., Stiegler, A.L., Boggon, T.J., Gamba, G., Lifton, R.P., 2013. Mineralocorticoid Receptor Phosphorylation Regulates Ligand Binding and Renal Response to Volume Depletion and Hyperkalemia. *Cell Metab.* 18, 660–671. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.005>

- Shin, C., Nam, J.-W., Farh, K.K.-H., Chiang, H.R., Shkumatava, A., Bartel, D.P., 2010. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol. Cell* 38, 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.005>
- Shrestha, A., Che, R.-C., Zhang, A.-H., 2019. Role of Aldosterone in Renal Fibrosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1165, 325–346. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_15
- Simon, D.B., Karet, F.E., Hamdan, J.M., DiPietro, A., Sanjad, S.A., Lifton, R.P., 1996. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat. Genet.* 13, 183–188. <https://doi.org/10.1038/ng0696-183>
- Simpson, S.A., Tait, J.F., Wettstein, A., Neher, R., Von Euw, J., Schindler, O., Reichstein, T., 1954. [Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid]. *Experientia* 10, 132–133. <https://doi.org/10.1007/BF02158515>
- Sinha, S., Dutta, S., Datta, K., Ghosh, A.K., Mukhopadhyay, D., 2009. Von Hippel-Lindau gene product modulates TIS11B expression in renal cell carcinoma: impact on vascular endothelial growth factor expression in hypoxia. *J. Biol. Chem.* 284, 32610–32618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058065>
- Slezak-Prochazka, I., Kluiver, J., de Jong, D., Kortman, G., Halsema, N., Poppema, S., Kroesen, B.-J., van den Berg, A., 2013. Cellular localization and processing of primary transcripts of exonic microRNAs. *PLoS One* 8, e76647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076647>
- Söber, S., Laan, M., Annilo, T., 2010. MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 727–732. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.128>
- Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D., Pearce, D., 2010. Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 stability and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 285, 39905–39913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161133>
- Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D., Pearce, D., 2007. Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms. *J. Biol. Chem.* 282, 36303–36313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707287200>
- Soundararajan, R., Zhang, T.T., Wang, J., Vandewalle, A., Pearce, D., 2005. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J. Biol. Chem.* 280, 39970–39981. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508658200>
- Srikantan, S., Abdelmohsen, K., Lee, E.K., Tominaga, K., Subaran, S.S., Kuwano, Y., Kulshrestha, R., Panchakshari, R., Kim, H.H., Yang, X., Martindale, J.L., Marasa, B.S., Kim, M.M., Wersto, R.P., Indig, F.E., Chowdhury, D., Gorospe, M., 2011. Translational control of TOP2A influences doxorubicin efficacy. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3790–3801. <https://doi.org/10.1128/MCB.05639-11>

- Srikantan, S., Tominaga, K., Gorospe, M., 2012. Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 372–379. <https://doi.org/10.2174/138920312801619394>
- Staub, O., Abriel, H., Plant, P., Ishikawa, T., Kanelis, V., Saleki, R., Horisberger, J.D., Schild, L., Rotin, D., 2000. Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int.* 57, 809–815. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00919.x>
- Stocco, D.M., 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 193–213. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.193>
- Sulemanji, M., Vakili, K., 2013. Neonatal renal physiology. *Semin. Pediatr. Surg.* 22, 195–198. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2013.10.008>
- Summa, V., Mordasini, D., Roger, F., Bens, M., Martin, P.Y., Vandewalle, A., Verrey, F., Féraillé, E., 2001. Short term effect of aldosterone on Na,K-ATPase cell surface expression in kidney collecting duct cells. *J. Biol. Chem.* 276, 47087–47093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107165200>
- Sun, H., Li, Q.-W., Lv, X.-Y., Ai, J.-Z., Yang, Q.-T., Duan, J.-J., Bian, G.-H., Xiao, Y., Wang, Y.-D., Zhang, Z., Liu, Y.-H., Tan, R.-Z., Yang, Y., Wei, Y.-Q., Zhou, Q., 2010. MicroRNA-17 post-transcriptionally regulates polycystic kidney disease-2 gene and promotes cell proliferation. *Mol. Biol. Rep.* 37, 2951–2958. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9861-3>
- Sun, I.O., Lerman, L.O., 2019. Urinary microRNA in kidney disease: utility and roles. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 316, F785–F793. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00368.2018>
- Sun, X.-N., Li, C., Liu, Yuan, Du, L.-J., Zeng, M.-R., Zheng, X.-J., Zhang, W.-C., Liu, Yan, Zhu, M., Kong, D., Zhou, L., Lu, L., Shen, Z.-X., Yi, Y., Du, L., Qin, M., Liu, X., Hua, Z., Sun, S., Yin, H., Zhou, B., Yu, Y., Zhang, Z., Duan, S.-Z., 2017. T-Cell Mineralocorticoid Receptor Controls Blood Pressure by Regulating Interferon-Gamma. *Circ. Res.* 120, 1584–1597. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310480>
- Sun, Y.-F., Ma, L., Gong, X.-H., Hong, W.-C., Cai, C., 2020. [Expression of microRNA-495-5p in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia: a bioinformatics analysis]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi Chin. J. Contemp. Pediatr.* 22, 24–30.
- Suzuki, S., Tsubochi, H., Suzuki, T., Darnel, A.D., Krozowski, Z.S., Sasano, H., Kondo, T., 2001. Modulation of transalveolar fluid absorption by endogenous aldosterone in adult rats. *Exp. Lung Res.* 27, 143–155. <https://doi.org/10.1080/019021401750069384>
- Taira, M., Toba, H., Murakami, M., Iga, I., Serizawa, R., Murata, S., Kobara, M., Nakata, T., 2008. Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.019>

- Tait, S.A.S., Tait, J.F., Coghlan, J.P., 2004. The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 217, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.004>
- Tang, S.C.W., Chan, G.C.W., Lai, K.N., 2016. Recent advances in managing and understanding diabetic nephropathy. *F1000Research* 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7693.1>
- Taouis, M., 2016. MicroRNAs in the hypothalamus. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 641–651. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.11.006>
- Teixeira, M., Viengchareun, S., Butlen, D., Ferreira, C., Cluzeaud, F., Blot-Chaubaud, M., Lombès, M., Ferrary, E., 2006. Functional IsK/KvLQT1 potassium channel in a new corticosteroid-sensitive cell line derived from the inner ear. *J. Biol. Chem.* 281, 10496–10507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512254200>
- Tirard, M., Almeida, O.F.X., Hutzler, P., Melchior, F., Michaelidis, T.M., 2007. Sumoylation and proteasomal activity determine the transactivation properties of the mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 268, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.01.010>
- Tran, U., Zakin, L., Schweickert, A., Agrawal, R., Döger, R., Blum, M., De Robertis, E.M., Wessely, O., 2010. The RNA-binding protein bicaudal C regulates polycystin 2 in the kidney by antagonizing miR-17 activity. *Dev. Camb. Engl.* 137, 1107–1116. <https://doi.org/10.1242/dev.046045>
- Trapp, T., Rupprecht, R., Castrén, M., Reul, J.M., Holsboer, F., 1994. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13, 1457–1462. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90431-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90431-6)
- Trionfini, P., Benigni, A., Remuzzi, G., 2015. MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 11, 23–33. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.202>
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langhein, A., Burwinkel, B., 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>
- Ueda, K., Fujiki, K., Shirahige, K., Gomez-Sanchez, C.E., Fujita, T., Nangaku, M., Nagase, M., 2014. Genome-wide analysis of murine renal distal convoluted tubular cells for the target genes of mineralocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.125>
- Ueda, K., Nagase, M., 2014. Mineralocorticoid receptor activation as an etiological factor in kidney diseases. *Clin. Exp. Nephrol.* 18, 16–23. <https://doi.org/10.1007/s10157-013-0827-3>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>

- Valera, V.A., Walter, B.A., Linehan, W.M., Merino, M.J., 2011. Regulatory Effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL Gene Expression and the Hypoxic Activation of miR-210 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Cancer* 2, 515–526. <https://doi.org/10.7150/jca.2.515>
- Vallet, V., Chraïbi, A., Gaeggeler, H.P., Horisberger, J.D., Rossier, B.C., 1997. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389, 607–610. <https://doi.org/10.1038/39329>
- van der Ree, M.H., van der Meer, A.J., de Bruijne, J., Maan, R., van Vliet, A., Welzel, T.M., Zeuzem, S., Lawitz, E.J., Rodriguez-Torres, M., Kupcova, V., Wiercinska-Drapalo, A., Hodges, M.R., Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., 2014. Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res.* 111, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.08.015>
- Van Eekelen, J.A., Jiang, W., De Kloet, E.R., Bohn, M.C., 1988. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 21, 88–94. <https://doi.org/10.1002/jnr.490210113>
- van Eekelen, J.A., Rots, N.Y., Sutanto, W., Oitzl, M.S., de Kloet, E.R., 1991. Brain corticosteroid receptor gene expression and neuroendocrine dynamics during aging. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 679–683. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(91\)90290-I](https://doi.org/10.1016/0960-0760(91)90290-I)
- van Leeuwen, N., Bellingrath, S., de Kloet, E.R., Zitman, F.G., DeRijk, R.H., Kudielka, B.M., Wüst, S., 2011. Human mineralocorticoid receptor (MR) gene haplotypes modulate MR expression and transactivation: implication for the stress response. *Psychoneuroendocrinology* 36, 699–709. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.10.003>
- van Leeuwen, N., Kumsta, R., Entringer, S., de Kloet, E.R., Zitman, F.G., DeRijk, R.H., Wüst, S., 2010. Functional mineralocorticoid receptor (MR) gene variation influences the cortisol awakening response after dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology* 35, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.07.006>
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>
- Veronese, A., Lupini, L., Consiglio, J., Visone, R., Ferracin, M., Fornari, F., Zanesi, N., Alder, H., D’Elia, G., Gramantieri, L., Bolondi, L., Lanza, G., Querzoli, P., Angioni, A., Croce, C.M., Negrini, M., 2010. Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res.* 70, 3140–3149. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4456>
- Verrey, F., 1995. Transcriptional control of sodium transport in tight epithelial by adrenal steroids. *J. Membr. Biol.* 144, 93–110.

- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., Remaley, A.T., 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–433. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>
- Viengchareun, S., Kamenicky, P., Teixeira, M., Butlen, D., Meduri, G., Blanchard-Gutton, N., Kurschat, C., Lanel, A., Martinerie, L., Sztal-Mazer, S., Blot-Chabaud, M., Ferrary, E., Cherradi, N., Lombès, M., 2009. Osmotic Stress Regulates Mineralocorticoid Receptor Expression in a Novel Aldosterone-Sensitive Cortical Collecting Duct Cell Line. *Mol. Endocrinol.* 23, 1948–1962. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0095>
- Viengchareun, S., Lema, I., Lamribet, K., Keo, V., Blanchard, A., Cherradi, N., Lombès, M., 2014. Hypertonicity Compromises Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling through Tis11b-Mediated Post-Transcriptional Control. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 2213–2221. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013091023>
- Viengchareun, S., Menuet, D.L., Martinerie, L., Munier, M., Tallec, L.P.-L., Lombès, M., 2007. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl. Recept. Signal.* 5. <https://doi.org/10.1621/nrs.05012>
- Viengchareun, S., Pussard, E., Castanet, M., Sachs, L.M., Vu, T.A., Boileau, P., Lombès, M., Martinerie, L., 2021. The invention of aldosterone, how the past resurfaces in pediatric endocrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 111375. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111375>
- Vogt, M., Munding, J., Grüner, M., Liffers, S.-T., Verdoodt, B., Hauk, J., Steintraesser, L., Tannapfel, A., Hermeking, H., 2011. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 458, 313–322. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-1030-5>
- Walani, S.R., 2020. Global burden of preterm birth. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* 150, 31–33. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13195>
- Wallace, A.D., Cidlowski, J.A., 2001. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 276, 42714–42721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106033200>
- Wang, X., Skelley, L., Cade, R., Sun, Z., 2006. AAV delivery of mineralocorticoid receptor shRNA prevents progression of cold-induced hypertension and attenuates renal damage. *Gene Ther.* 13, 1097–1103. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302768>
- Wang, Y., Li, H., Zhu, Q., Li, X., Lin, Z., Ge, R.-S., 2019. The cross talk of adrenal and Leydig cell steroids in Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 192, 105386. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105386>

- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D.J., Wang, K., 2010. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin. Chem.* 56, 1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Wehling, M., Käsmayr, J., Theisen, K., 1991. Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am. J. Physiol.* 260, E719-726. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1991.260.5.E719>
- Wei, Q., Mi, Q.-S., Dong, Z., 2013. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB Life* 65, 602–614. <https://doi.org/10.1002/iub.1174>
- Wessely, O., Agrawal, R., Tran, U., 2010. MicroRNAs in kidney development: lessons from the frog. *RNA Biol.* 7, 296–299. <https://doi.org/10.4161/rna.7.3.11692>
- Wils, J., Duparc, C., Cailleux, A.-F., Lopez, A.-G., Guiheneuf, C., Boutelet, I., Boyer, H.-G., Dubessy, C., Cherifi, S., Cauliez, B., Gobet, F., Defortescu, G., Ménard, J.-F., Louiset, E., Lefebvre, H., 2020. The neuropeptide substance P regulates aldosterone secretion in human adrenals. *Nat. Commun.* 11, 2673. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16470-8>
- Wilson, F.H., Disse-Nicodème, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J.M., Feely, M.P., Dussol, B., Berland, Y., Unwin, R.J., Mayan, H., Simon, D.B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X., Lifton, R.P., 2001. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293, 1107–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1062844>
- Wulfken, L.M., Moritz, R., Ohlmann, C., Holdenrieder, S., Jung, V., Becker, F., Herrmann, E., Walgenbach-Brünagel, G., von Ruecker, A., Müller, S.C., Ellinger, J., 2011. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PloS One* 6, e25787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025787>
- Xie, Y., Jia, Y., Cuihua, X., Hu, F., Xue, M., Xue, Y., 2017. Urinary Exosomal MicroRNA Profiling in Incipient Type 2 Diabetic Kidney Disease. *J. Diabetes Res.* 2017, 6978984. <https://doi.org/10.1155/2017/6978984>
- Xue, R., Gui, D., Zheng, L., Zhai, R., Wang, F., Wang, N., 2017. Mechanistic Insight and Management of Diabetic Nephropathy: Recent Progress and Future Perspective. *J. Diabetes Res.* 2017, 1839809. <https://doi.org/10.1155/2017/1839809>
- Yamamura, S., Saini, S., Majid, S., Hirata, H., Ueno, K., Chang, I., Tanaka, Y., Gupta, A., Dahiya, R., 2012. MicroRNA-34a suppresses malignant transformation by targeting c-Myc transcriptional complexes in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 33, 294–300. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr286>
- Yan, B., Guo, J.-T., Zhao, L.-H., Zhao, J.-L., 2012a. MiR-30c: a novel regulator of salt tolerance in tilapia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.088>

- Yan, B., Zhao, L.-H., Guo, J.-T., Zhao, J.-L., 2012b. miR-429 regulation of osmotic stress transcription factor 1 (OSTF1) in tilapia during osmotic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.029>
- Yang, C., Ma, X., Guan, G., Liu, H., Yang, Y., Niu, Q., Wu, Z., Jiang, Y., Bian, C., Zang, Y., Zhuang, L., 2019. MicroRNA-766 promotes cancer progression by targeting NR3C2 in hepatocellular carcinoma. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 33, 1456–1467. <https://doi.org/10.1096/fj.201801151R>
- Yang, L.-M., Rinke, R., Korbmacher, C., 2006. Stimulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by cAMP involves putative ERK phosphorylation sites in the C termini of the channel's beta- and gamma-subunit. *J. Biol. Chem.* 281, 9859–9868. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512046200>
- Yang, S., He, P., Wang, J., Schetter, A., Tang, W., Funamizu, N., Yanaga, K., Uwagawa, T., Satoskar, A.R., Gaedcke, J., Bernhardt, M., Ghadimi, B.M., Gaida, M.M., Bergmann, F., Werner, J., Ried, T., Hanna, N., Alexander, H.R., Hussain, S.P., 2016. A Novel MIF Signaling Pathway Drives the Malignant Character of Pancreatic Cancer by Targeting NR3C2. *Cancer Res.* 76, 3838–3850. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2841>
- Yang, X.-J., Chiang, C.-M., 2013. Sumoylation in gene regulation, human disease, and therapeutic action. *F1000prime Rep.* 5, 45. <https://doi.org/10.12703/P5-45>
- Yekta, S., Shih, I.-H., Bartel, D.P., 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594–596. <https://doi.org/10.1126/science.1097434>
- Yu, M., Yu, H.-L., Li, Q.-H., Zhang, L., Chen, Y.-X., 2019. miR-4709 overexpression facilitates cancer proliferation and invasion via downregulating NR3C2 and is an unfavorable prognosis factor in colon adenocarcinoma. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 33, e22411. <https://doi.org/10.1002/jbt.22411>
- Yun, S.J., Jeong, P., Kim, W.-T., Kim, T.H., Lee, Y.-S., Song, P.H., Choi, Y.-H., Kim, I.Y., Moon, S.-K., Kim, W.-J., 2012. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. *Int. J. Oncol.* 41, 1871–1878. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1622>
- Zaman, M.S., Shahryari, V., Deng, G., Thamminana, S., Saini, S., Majid, S., Chang, I., Hirata, H., Ueno, K., Yamamura, S., Singh, K., Tanaka, Y., Tabatabai, Z.L., Dahiya, R., 2012. Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival. *PLoS One* 7, e31060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031060>
- Zendjabil, M., Favard, S., Tse, C., Abbou, O., Hainque, B., 2017. [The microRNAs as biomarkers: What prospects?]. *C. R. Biol.* 340, 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.12.001>
- Zennaro, M.C., Farman, N., Bonvalet, J.P., Lombès, M., 1997. Tissue-specific expression of alpha and beta messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal

- and pathological states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1345–1352. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.5.3933>
- Zennaro, M.-C., Keightley, M.-C., Kotelevtsev, Y., Conway, G.S., Soubrier, F., Fuller, P.J., 1995. Human Mineralocorticoid Receptor Genomic Structure and Identification of Expressed Isoforms. *J. Biol. Chem.* 270, 21016–21020. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21016>
- Zennaro, M.C., Le Menuet, D., Lombès, M., 1996. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 10, 1549–1560. <https://doi.org/10.1210/mend.10.12.8961265>
- Zennaro, M.C., Le Menuet, D., Viengchareun, S., Walker, F., Ricquier, D., Lombès, M., 1998. Hibernoma development in transgenic mice identifies brown adipose tissue as a novel target of aldosterone action. *J. Clin. Invest.* 101, 1254–1260. <https://doi.org/10.1172/JCI1915>
- Zennaro, M.C., Souque, A., Viengchareun, S., Poisson, E., Lombès, M., 2001. A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 1586–1598. <https://doi.org/10.1210/mend.15.9.0689>
- Zhai, Q., Zhou, L., Zhao, C., Wan, J., Yu, Z., Guo, X., Qin, J., Chen, J., Lu, R., 2012. Identification of miR-508-3p and miR-509-3p that are associated with cell invasion and migration and involved in the apoptosis of renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419, 621–626. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.060>
- Zhang, A., Liu, Y., Shen, Y., Xu, Y., Li, X., 2011. miR-21 modulates cell apoptosis by targeting multiple genes in renal cell carcinoma. *Urology* 78, 474.e13–19. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.03.030>
- Zhang, W., Xia, X., Reisenauer, M.R., Hemenway, C.S., Kone, B.C., 2006. Dot1a-AF9 complex mediates histone H3 Lys-79 hypermethylation and repression of ENaC α in an aldosterone-sensitive manner. *J. Biol. Chem.* 281, 18059–18068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601903200>
- Zhang, Y., Zeng, H.-H., 2020. Renal Function Profiles in Preterm Neonates With Birth Asphyxia Within the First 24 H of Life. *Front. Pediatr.* 8, 583540. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.583540>
- Zhang, Z., Che, X., Yang, N., Bai, Z., Wu, Y., Zhao, L., Pei, H., 2017. miR-135b-5p Promotes migration, invasion and EMT of pancreatic cancer cells by targeting NR3C2. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 96, 1341–1348. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.074>
- Zhao, M., Mantel, I., Gelize, E., Li, X., Xie, X., Arboleda, A., Seminel, M., Levy-Boukris, R., Dernigoghossian, M., Prunotto, A., Andrieu-Soler, C., Rivolta, C., Canonica, J., Naud, M.-C., Lechner, S., Farman, N., Bravo-Osuna, I., Herrero-Vanrell, R., Jaisser, F., Behar-Cohen, F., 2019. Mineralocorticoid receptor antagonism limits experimental choroidal neovascularization and

- structural changes associated with neovascular age-related macular degeneration. *Nat. Commun.* 10, 369. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08125-6>
- Zhdanova, O., Srivastava, S., Di, L., Li, Z., Tchelebi, L., Dworkin, S., Johnstone, D.B., Zavadil, J., Chong, M.M., Littman, D.R., Holzman, L.B., Barisoni, L., Skolnik, E.Y., 2011. The inducible deletion of Drosha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* 80, 719–730. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.122>
- Zhong, X., Chung, A.C.K., Chen, H.Y., Dong, Y., Meng, X.M., Li, R., Yang, W., Hou, F.F., Lan, H.Y., 2013. miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 56, 663–674. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2804-x>
- Zhong, X., Chung, A.C.K., Chen, H.-Y., Meng, X.-M., Lan, H.Y., 2011. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 1668–1681. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010111168>
- Ziera, T., Irlbacher, H., Fromm, A., Latouche, C., Krug, S.M., Fromm, M., Jaisser, F., Borden, S.A., 2009. Cnksr3 is a direct mineralocorticoid receptor target gene and plays a key role in the regulation of the epithelial sodium channel. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3936–3946. <https://doi.org/10.1096/fj.09-134759>

ANNEXES

Article 3

Sexual Dimorphism of Corticosteroid Signaling During Kidney Development

Margaux Laulhé, Laurence Dumeige, **Thi An Vu**, Imène Hani, Eric Pussard, Marc Lombès,
Say Viengchareun, Laetitia Martinerie.

International Journal of Molecular Sciences

Special Issue on “Sexual Dimorphism in (Non Reproductive) Endocrine Diseases”



Review

Sexual Dimorphism of Corticosteroid Signaling during Kidney Development

Margaux Laulhé¹, Laurence Dumeige^{1,2}, Thi An Vu¹, Imene Hani¹, Eric Pussard^{1,3}, Marc Lombès¹, Say Viengchareun¹  and Laetitia Martinerie^{1,2,*}

¹ Université Paris-Saclay, Inserm, Physiologie et Physiopathologie Endocrinienne, CEDEX, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; margaux.laulhe@universite-paris-saclay.fr (M.L.); laurence.dumeige@aphp.fr (L.D.); thi-an.vu@universite-paris-saclay.fr (T.A.V.); imene.hani@universite-paris-saclay.fr (I.H.); eric.pussard@aphp.fr (E.P.); marc.lombes@universite-paris-saclay.fr (M.L.); say.viengchareun@universite-paris-saclay.fr (S.V.)

² Pediatric Endocrinology Department, Hôpital Universitaire Robert Debre, France & Université de Paris, 75019 Paris, France

³ Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

* Correspondence: laetitia.martinerie@aphp.fr

¹ Université Paris-Saclay, Inserm, Physiologie et Physiopathologie Endocrinienne, CEDEX, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; margaux.laulhe@universite-paris-saclay.fr (M.L.); laurence.dumeige@aphp.fr (L.D.); thi-an.vu@universite-paris-saclay.fr (T.A.V.); imene.hani@universite-paris-saclay.fr (I.H.); eric.pussard@aphp.fr (E.P.); marc.lombes@universite-paris-saclay.fr (M.L.); say.viengchareun@universite-paris-saclay.fr (S.V.)

* Correspondence: laetitia.martinerie@aphp.fr

Abstract: Sexual dimorphism involves differences between biological sexes that go beyond sexual characteristics. In mammals, differences between sexes have been demonstrated regarding various biological processes, including blood pressure and predisposition to develop hypertension early in adulthood, which may rely on early events during development and in the neonatal period. Recent studies suggest that corticosteroid signaling pathways (comprising glucocorticoid and mineralocorticoid signaling pathways) have distinct tissue-specific expression and regulation during this specific temporal window in a sex-dependent manner, most notably in the kidney. This review outlines the evidence for a gender differential expression and activation of renal corticosteroid signaling pathways in the mammalian fetus and neonate, from mouse to human, that may favor mineralocorticoid signaling in females and glucocorticoid signaling in males. Determining the effects of such differences may shed light on short term and long term pathophysiological consequences, markedly for males.

Keywords: aldosterone; cortisol; mineralocorticoid and glucocorticoid receptors; neonates; kidney; development; sexual dimorphism



Citation: Laulhé, M.; Dumeige, L.; Vu, T.A.; Hani, I.; Pussard, E.; Lombès, M.; Viengchareun, S.; Martinerie, L. Sexual Dimorphism of Corticosteroid Signaling during Kidney Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5275. <https://doi.org/10.3390/ijms22105275>

Academic Editor: Antoine Martinez

Received: 17 April 2021

Accepted: 10 May 2021

Published: 18 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Corticosteroids (mineralocorticosteroids and glucocorticosteroids) are crucial hormones implicated in the function of many tissues to maintain homeostasis. Their major actions rely on their binding to the Mineralocorticoid and Glucocorticoid receptors (MR and GR, respectively). Recent studies have emphasized a particular temporal window during kidney development, which is well-conserved between mammals, where corticosteroid signaling pathways have a specific pattern of expression and regulation, in relation to the adaptation of the fetus and the neonate, transitioning from a water to an air environment. This review will first present a brief description of mineralocorticoid and glucocorticoid signaling pathways (from aldosterone and cortisol biosynthesis to mechanisms of regulation and action of MR and GR) during kidney development. Particular emphasis will be placed on recent studies highlighting a sexually dimorphic expression, which may have a pathophysiological impact, especially in males/boys, who experience increased difficulties to adapt during the neonatal period and are at higher risk of developing early hypertension later in life.

2. Mineralocorticoid Signaling Pathway

2.1. Regulation of Aldosterone Synthesis

Aldosterone, a steroid hormone secreted by the *Zona Glomerulosa* (ZG), the outer layer of the adrenal gland cortex, is vital for maintaining body fluid and electrolyte homeostasis, through sodium retention and thereby controls blood pressure [1]. As the adrenal ZG has no capacity to store aldosterone once it is produced, the regulation of its secretion is inextricably linked to transcriptional activation as well as post-transcriptional modifications of steroidogenic enzymes. Acute aldosterone production is controlled by the early regulatory step of cholesterol uptake and conversion to pregnenolone that is mediated by the increased expression and phosphorylation of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR (encoded by the *STAR* gene). A late regulatory step controlling the expression of biosynthesis enzymes, particularly CYP11B2 (aldosterone synthase, encoded by *CYP11B2* gene), regulates chronic aldosterone production [2]. Aldosterone biosynthesis in the ZG is physiologically regulated by Angiotensin II (Ang II), potassium (K⁺), and at a lesser extent by the AdrenoCorticoTropic Hormone (ACTH). Other bioactive compounds (serotonin, leptin, endothelin, nitric oxide, catecholamines, atrial natriuretic peptide, neuropeptide substance P) released by adipocytes, mast cells, chromaffin cells, or nerve ending located close to ZG cells were also shown to stimulate aldosterone secretion [3,4]. Stimulation of the Renin–Angiotensin System (RAS) is initiated by increased sympathetic activity, reduced perfusion pressure in the renal afferent arterioles, or decreased sodium content in the *macula densa* of the renal distal tubules, which lead to the release of renin from juxtaglomerular cells. Afterwards, renin converts circulating angiotensinogen produced by the liver to angiotensin I (Ang I), which is subsequently cleaved by Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) to form the octapeptide Ang II. The binding of Ang II to its AT1 receptor (AT1R) triggers the release of calcium from intracellular stores, which is the major determinant of aldosterone secretion [3]. Small increases in extracellular K⁺ depolarize the glomerulosa cell, also increasing calcium influx through voltage-gated calcium channels that stimulates *CYP11B2* and *StAR* transcription [5]. Finally, ACTH alone stimulates aldosterone secretion acutely and transiently but to a lesser extent than Ang II and K⁺. ACTH binding to its Melanocortin Receptor 2 (MC2R) stimulates *StAR* expression through adenylate cyclase activation [6]. During development, fetal aldosterone production occurs in the definitive zone, which is the counterpart of the ZG of the adult adrenal cortex. While *StAR* and other important enzymes expression gradually rise during pregnancy [7], *CYP11B2* expression only appears around 24 gestational weeks (GW) [8]; then, it increases to reach at birth similar levels than in the adult adrenals [9]. Detectable plasma concentrations of aldosterone are found in premature newborns as early as 25 GW [10], but aldosterone production remains low until 30 GW [9]. Aldosterone concentration increases thereafter until term [10], in relation to a fetal neo-synthesis [11]. No sexual dimorphism has been demonstrated concerning plasma aldosterone levels in the fetus or at birth [12].

2.2. The Mineralocorticoid Receptor (MR)

2.2.1. Gene, Transcripts, and Protein Variants

MR belongs to the nuclear receptor superfamily that mediates sodium-retaining action of aldosterone in the distal nephron [13]. This transcription factor is encoded by the *NR3C2* gene, which is located in humans at locus 4q31.1–4q31.2 [14,15] and encodes a 984 amino-acids protein (≈107 kDa) [16], organized into four distinct structural domains: the N-terminal domain (NTD), the DNA binding domain (DBD), the hinge region, and the ligand binding domain (LBD). MR functions were shown to be modulated by splice variants, lacking either exon 6 or both exon 5 and 6 [17,18]. Two major variants of human MR, named MRA and MRB, are generated by alternative initiation sites of translation from methionine 1 and 15, respectively. These MR variants display distinct transactivation capacities in vitro [19].

2.2.2. Mechanisms of Regulation of MR Expression and Activity

Two alternative promoters drive expression of the *NR3C2* gene [20], the proximal P1 promoter, which is transcriptionally active in all MR target tissues, and the distal P2 promoter, which is weaker and transcriptionally active in the central nervous system during specific developmental stages or physiological situations [21]. Of particular interest, the expression of this nuclear receptor, which transcriptionally regulates water and sodium balance, is also controlled at the post-transcriptional level by osmotic tone, notably in the distal parts of the nephron, where large variations of extracellular tonicity prevail [22]. Indeed, MR transcript levels decrease under hypertonicity following recruitment of the RNA Binding Protein (RBP) Tis11b (tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11b), which physically interacts with 3'-untranslated region (3'-UTR) of MR transcript, thus modulating its mRNA turnover in response to osmotic stress [23]. On the opposite, MR transcript levels increase under hypotonicity thanks to the recruitment of Human antigen R (HuR), another RBP, which interacts with MR 3'-UTR in the cytoplasm of renal cells to stabilize and increase MR levels, thereby modulating MR signaling [24]. Accumulating evidence now underscores the pivotal role of microRNAs (miRNAs), an additional class of post-transcriptional regulators, in the control of MR expression in the kidney [25,26]. Beyond these regulatory mechanisms, MR activity and signaling are also modulated by post-translational modifications such as ubiquitylation, SUMOylation, phosphorylation, and acetylation [13,27].

3. Glucocorticoid Signaling Pathway

3.1. Glucocorticoid Hormones and the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis

Glucocorticoid hormones (cortisol and corticosterone in rodents) are the effector hormones of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal (HPA) axis of the neuroendocrine system and are produced by the adrenal *Zona Fasciculata* (ZF). As for all steroid hormones, cortisol synthesis begins from cholesterol and is critically dependent on the StAR protein, which facilitates a rapid flux of cholesterol into mitochondria. Then, the mitochondrial enzyme, cytochrome P450_{scc}, encoded by the *CYP11A1* gene cleaves cholesterol sidechain to pregnenolone. Pregnenolone passively diffuses into the endoplasmic reticulum and is converted to progesterone by the 2–3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5– Δ 4 isomerase (3 β HSD2), which is encoded by the *HSD3B2* gene. The specific expression of P450_{c17} (encoded by *CYP17A1* gene) catalyzes the 17 α -hydroxylation of progesterone to 17OH-progesterone (17OHP). Thereafter, 17OHP is successively converted to 11-deoxycortisol then to cortisol by the microsomal P450_{c21} and mitochondrial P450_{c11 β} (encoded by *CYP11B1* gene), respectively. In rodents, the ZF lacks P450_{c17} and progesterone is 21- and 11 β -hydroxylated to yield corticosterone, instead of cortisol, as the dominant glucocorticoid in these species [2]. Glucocorticoid synthesis is differentially regulated in the pre- and postnatal adrenal glands. In the adult, glucocorticoid production is critically controlled by the activity of the HPA axis. Various stimuli such as stress, illness, or the circadian rhythm activates the release of Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) from the hypothalamus, which stimulates the anterior pituitary gland, releasing ACTH. ACTH acts on MC2R in the adrenal ZF to induce corticosteroid synthesis from cholesterol. In turn, circulating glucocorticoids exert a feedback regulatory effect on the hypothalamus and on the pituitary to inhibit the release of CRH and ACTH, respectively [2]. Fetal adrenal glands are capable of steroidogenesis soon after their formation around the 7th GW. At the same time, the pituitary begins to produce ACTH. The secretion of cortisol increases to a peak at 8–9 GW; then, it decreases until 14 GW. This cyclic secretion of glucocorticoids by the fetal adrenal glands is not under control of the ACTH, as in adults [28]. Indeed, ACTH levels remain constant during this period and stimulate the adrenal glands to produce androgens. The expression of 3 β HSD2 that peaks at 9 GW decreases thereafter throughout most of the second trimester, leading to a reduction in glucocorticoid synthesis. At 24 GW, the expression of 3 β HSD2 and secretion of glucocorticoids resume. Cortisol surges in the weeks prior to birth and plays crucial roles in the differentiation and functional development of several organs such as the lungs [29]. Sexual dimorphism in HPA axis activity has been suggested

to be present in early childhood. In a meta-analysis, basal HPA axis activity was suggested to be greater among boys before 8 years of age, as assessed by salivary cortisol levels [30]. After 8 years, this trend seemed to reverse, suggesting a sex-specific evolution of cortisol metabolism around puberty [31] and a possible effect of early life programming [32]. However, no difference was observed at birth between girls and boys regarding basal plasma cortisol levels [33]. Cortisol metabolism relies on the activity of liver A-ring reductases (5- α and 5- β -reductase) and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) isoenzymes. The 11 β HSD1 enzyme is mainly expressed in the liver and adipose tissue, and it regenerates cortisol from its inactive compound cortisone. The 11 β HSD2 enzyme catalyzes the reverse reaction in renal epithelial cells (see Section 4.2). In adulthood, females were found to have a lower urinary excretion rate of cortisol metabolites in comparison to males, which was attributed to a less A-ring reduction [34]. This sex difference in cortisol metabolism begins around puberty, at the age of 10–11 years [31,35], and it is maintained in elderly subjects suggesting regulatory mechanisms partially independent from gonadal steroids [36].

3.2. The Glucocorticoid Receptor

3.2.1. Gene, Transcripts, and Protein Variants

GR is the founding member of the nuclear receptor superfamily. This transcription factor, similar to the MR, contains 4 main domains, the NTD, DBD, LBD and a Hinge Region (HR) between the DBD and the LBD [37]. It is encoded by the *NR3C1* gene located on chromosome 5 (5q31) in humans. The *NR3C1* gene contains at least 10 exons [38]. The alternative splicing of exon 9 produces the two major variants of the protein, GR α , which is the active ligand-dependent variant and GR β , which is a ligand-independent variant exerting dominant negative effect [39]. The GR α is a 777 amino acids length protein [40]. The GR protein contains sites for post-translational modifications, such as SUMOylation or phosphorylation, which influence its transactivation capacities.

3.2.2. Mechanisms of Regulation of GR Expression and Activity

GR is present in virtually all the cells, but sensitivity to glucocorticoids is tissue-dependent and partially mediated by regulation of GR expression. This regulation is mediated at the transcriptional level by two main mechanisms: alternative splicing of the 1st exon and variability in the length of the N-terminal domain. The first and untranslated exon contains nine splice donor sites well-preserved between species, corresponding to splice recipient sites on the exon 2 [41] each under the control of a specific promoter. This variability results in alternative mRNA isoforms, which differs in their 5'-UTR regions. The expression of those mRNA isoforms is tissue specific. The 2nd exon contains eight different start codons, encoding for eight variants of the GR (GR-A, GR-B, GR-C1, GR-C2, GR-C3, GR-D1, GR-D2, and GR-D3). These variants have equal affinity for the ligand but differ in transactivation capacities and target genes, with only <10% of them common to all variants [42].

4. Mechanism of Corticosteroids Action in Renal Principal Cells

4.1. Subcellular Distribution

In renal principal cells, corticosteroid hormones enter by passive diffusion and bind their respective receptor: aldosterone to the MR and cortisol (or corticosterone) to the GR. In the absence of ligands, corticosteroid receptors are associated to chaperone proteins [43–46], which protect receptors from degradation and maintain a conformation suitable for binding to ligands. Thereafter, the binding of either ligand induces the dissociation of these chaperone proteins and conformational changes of MR and GR.

4.2. Mineralocorticoid Selectivity

Given the homology existing between the structure of aldosterone and cortisol/corticosterone, the high homology between MR and GR (their DBD and LBD have 94% and 57% homology, respectively [47]), and similar affinity of both receptors for glucocorticoid hormones, MR would be expected to be permanently occupied by glucocorticoid hormones.

Indeed, cortisol plasma concentrations are up to 100 to 1000 times higher than that of aldosterone in mammals. However, MR illicit occupation by glucocorticoid hormones is limited in renal principal and other epithelial cells by the action of the 11 β HSD2 [48–50]. This enzyme oxidizes the alcohol function carried by carbon 11 of the glucocorticoid hormones into a ketone function, thus producing 11 β dehydrogenated derivatives (cortisone in humans and 11-dehydrocorticosterone in rodents) that have little or no affinity for MR, or even for GR [48]. Thus, the 11 β HSD2 allows aldosterone to act selectively onto MR in epithelial cells to specifically exert its biological effects on sodium reabsorption (Figure 1). In addition, MR can also discriminate between aldosterone and cortisol because dissociation rates are much faster for glucocorticoids than for aldosterone. Distinct interactions between the NTD and the LBD occur because the aldosterone–MR complex adopts structural conformation somehow different from that of the glucocorticoid–MR complex [51]. Finally, it has been shown that the nature of the ligand might also modify the cyclicity of the interaction between ligand–receptor complex with DNA responsive elements [52].

4.3. Promoter Binding and Recruitment of Coregulators

Once in the nucleus, the aldosterone–MR complex binds mostly as homodimers to Mineralocorticoid Response Elements (MREs) located in the regulatory regions of MR target genes [53]. Then, MR interacts, in a cyclic, sequential, and/or combinatorial manner [52], with transcriptional coregulators [54] and some basal transcription factors or components of the machinery to enhance transcriptional activation and to facilitate chromatin remodeling involving histone acetylation/methylation [53]. Interestingly, Le Billan et al., used HK-GFP-MR cells, a human renal cell line that is devoid of 11 β HSD2 to decipher the respective contribution of MR/GR and aldosterone/cortisol in renal corticosteroid signaling. These authors provided evidence that MR and GR dynamically and cyclically interact at the same target promoter on the *Period circadian protein 1 (PER1)* gene, in a specific and distinct transcriptional signature, by binding as homo- or heterodimers [52]. In the nucleus, the GR can also bind specific sequences called Glucocorticoid Response Elements (GREs). In each cell type, GR binds different GREs. Binding to the GRE activates the recruitment of chromatin-remodeling complexes and coregulators, such as steroid receptor coactivator-1 (SRC-1), which allows the formation of the transcription initiation complex. Negative GRE (nGRE) were also reported, which are responsible for trans-repression of the target genes. Binding to nGRE prevents the dimerization and allows for the recruitment of corepressors, such as NCoR or SMRT [55]. GR can also mediate trans-repression of target genes by tethering as described for the MR [53] via interactions with other transcription factors as NF- κ B or AP-1 without direct binding to DNA [56].

4.4. MR and GR Target Genes

In the aldosterone-sensitive nephron, MR participates in the control of salt balance by stimulating expression of ionic transporters such as the Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) [57] and the Na⁺, K⁺-ATPase pump [58]. These transporters enable the transepithelial reabsorption of sodium from the lumen to the *interstitium*. Aldosterone also stimulates, via MR activation, early expression of the Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) [59], which phosphorylates the ubiquitin ligase Nedd4-2, which in turn controls the retrieval of ENaC from the apical membrane. Other target genes have also been identified in the kidney, including the *serine/threonine kinase With No lysine K kinase (KS-WNK1)* [60], the *N-myc Down-Regulated Gene 2 (NDRG2)* [61], the *Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper protein (GILZ)* [62], which also play pivotal roles during the early phase of aldosterone responses [13] (Figure 1). Recently, aldosterone was shown to regulate the rhythmicity of renal sodium reabsorption by stimulating the early expression of the *PER1* gene [63]. It was also reported that MR can indirectly bind to recognition motifs for other transcription factors (FOX, EGR1, AP1, PAX5) through tethering mechanisms, as reported for the GR, thus enabling the modulation of target gene expression [53]. In adult kidney, as 11 β HSD2 expression is high, no major effect of GR signaling is expected under basal conditions [64].

Importantly, our group has recently identified a specific temporal window during renal development, during which this MR signaling is ineffective due to the down-regulation of MR expression [65]. Therefore, given that renal 11β HSD2 is not expressed during this specific perinatal period, GR signaling should be functional in renal principal cells, with plasma cortisol levels detectable in physiological amounts in newborns similar to adult levels [66]. In this context, GR is likely to activate specific renal target genes as well as common target genes with those of the MR including *SGK1* or *GILZ*. GR and MR-specific target genes in renal principal cells are summarized in Table 1.

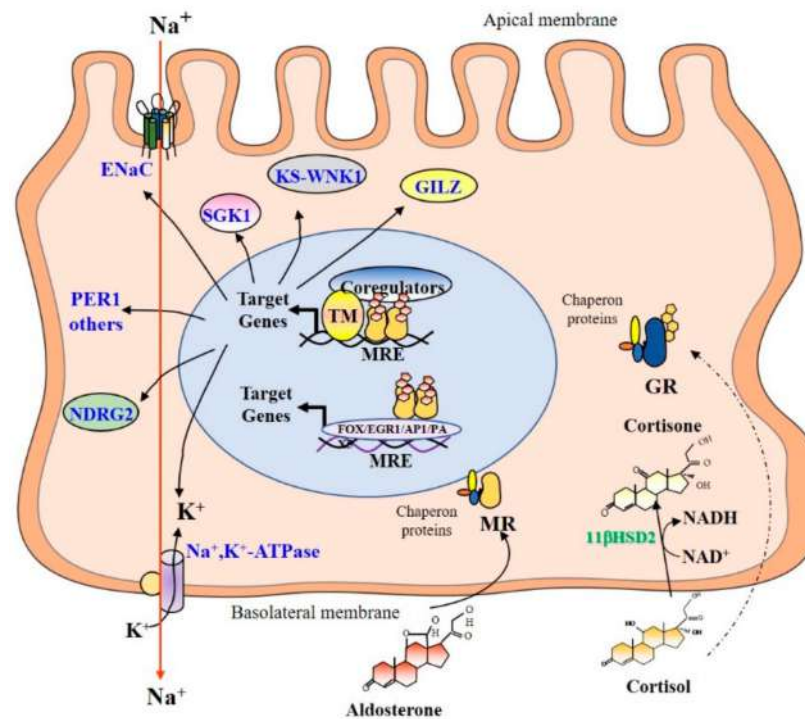


Figure 1. Mineralocorticoid and glucocorticoid signaling in renal principal cells. Corticosteroid hormones enter by passive diffusion and bind their respective receptor: aldosterone to MR and cortisol/corticosterone to GR. In the absence of ligands, corticosteroid receptors are associated to chaperone proteins. Thereafter, the binding of either ligand induces the dissociation of these chaperone proteins and conformational changes of MR and GR. In the nucleus, the aldosterone/MR complex binds mostly as homodimers to Mineralocorticoid Response Elements (MREs). Then, MR interacts, in a cyclic, sequential, and/or combinatorial manner, with transcriptional coregulators and some basal transcription factors or components of the machinery to enhance the transcription of target genes, including the Epithelial Na^+ Channel (ENaC), the Na^+ , K^+ -ATPase pump. Aldosterone also stimulates early expression of the *Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1* (*SGK1*), the *serine/threonine kinase With No lysine K kinase* (*KS-WNK1*), the *N-myc Down-Regulated Gene 2* (*NDRG2*), and the *Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper protein* (*GILZ*). Recently, aldosterone was shown to stimulate early expression the *PER1* gene, which belongs to the circadian clock gene family. It was also reported that MR can indirectly bind to recognition motifs for other transcription factors (FOX, EGR1, AP1, PAX5) through tethering mechanisms. In principal renal cells, the 11β HSD2 converts glucocorticoid hormones into cortisone or 11-dehydrocorticosterone that have little or no affinity for MR, or even for GR. Thus, the 11β HSD2 allows aldosterone to act selectively onto MR to specifically exert its biological effects on sodium reabsorption. In addition, GR is not or weakly activated. MR: Mineralocorticoid Receptor; GR: Glucocorticoid Receptor; MRE: Mineralocorticoid Response Element; GILZ: Glucocorticoid-induced leucine zipper; ENaC: Epithelial Na^+ Channel; Sgk 1: Serum and Glucocorticoid-Regulated kinase 1; KS-WNK1: With No lysine K kinase; NDRG2: N-myc Down-Regulated Gene 2; PER 1: clock gene period 1; TM: Transcriptional Machinery.

Table 1. MR and GR target genes in renal principal cells.

Target Genes	Nuclear Receptors	Functions	References
α ENAC subunit	MR	Na ⁺ transport	[57]
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	MR	Na ⁺ transport	[58]
KS-WNK1	MR	Na ⁺ transport	[60]
PER1	MR, GR	Circadian rhythm	[63]
NDRG2	MR	Cell differentiation	[61]
SGK1	GR, MR	Ser/Thr protein kinase ENAC trafficking/Na ⁺ reabsorption	[59]
GILZ	GR, MR	ENAC trafficking/Na ⁺ reabsorption	[62]
FKBP5	GR, MR	Chaperone protein	[67]

5. Sexual Dimorphism of Corticosteroid Signaling Aside from the Kidney

Several studies have provided evidence for a gender differential expression and activation of MR and GR. For instance, repeated antenatal glucocorticoid treatment was shown to program HPA function in a sex-specific manner, and these changes were associated with the modification of MR and GR expression in the adult brain and pituitary [68]. During development, the same authors observed decreased GR mRNA in the paraventricular nucleus, decreased MR mRNA and MR protein in the hippocampus, and increased GR mRNA and GR protein in the hippocampus. In guinea pig, maternally administered glucocorticoids reduced fetal plasma ACTH and cortisol concentrations and significantly affected hippocampal MR protein expression, and this effect was greatest in males. The sex differences in the pattern of GR and MR expression during development may indicate different windows of vulnerability to prenatal glucocorticoid exposure in fetal life [69]. These corticosteroid receptors were also shown to play a pivotal role in the modulation of stress response in the rat brain. Indeed, the contribution of gender and of the cellular environment of certain brain areas to the expression of MR and GR was reported following restraint stress [70]. Furthermore, the same group observed that female rats presented with a distinct mechanism of regulating GR/MR ratio in the hippocampus upon chronic stress, while the female hypothalamus was more prone than the male to changing corticosteroid receptor expression in response to restraint stress. Few other studies have also reported gender differences in MR expression and activation in the heart [71–73]. Similarly, it has been shown that glucocorticoids exert their actions, notably anti-inflammatory activity, in a sexually dimorphic manner [74,75]. In addition, estrogens can antagonize GR-induction of the *GILZ* gene [76]. Whether the regulatory mechanisms implicated in MR and GR expression, or their coregulators expression, could contribute to the emergence of a sexual dimorphism remain to be explored. Finally, to the best of our knowledge, only one study has reported a sexual dimorphism for corticosteroid receptors expression in the kidney [77].

6. Gender Differences in Kidney Development and Organogenesis

Kidney organogenesis is a complex process involving three successive structures, of which only the last one, the metanephros, will give the definitive kidney [78]. The metanephros develops from the caudal nephrotomes starting from the 5th GW, and its maturation continues until the end of the first year of postnatal life in humans [65], with parallel maturation of the nephrons and of the different parts of the collecting ducts [79]. Renal ontogeny starts by the interaction between the mesenchymal cells of the metanephros, which will give the future nephronic structures, and the ureteral bud, an epithelial structure developed from the Wolffian duct, from which the renal collecting system will develop by successive dichotomies, according to a classical branching morphogenesis [80]. Each branch from the ureteral bud is capped by metanephronic cells, which are progenitor stem cells that are capable of differentiating into all the cell types composing the glomeruli and

nephrons [81]. These differentiation mechanisms are possible thanks to a dialogue between the two structures and the successive expression of different signaling pathways [82,83], some of which are epigenetically regulated [84] and thus potentially impacted by adverse events occurring during pregnancy. In particular, Ang II, acting on the AT1R, mediates the growth and proliferation of renal tubules and branching morphogenesis [85]. In contrast, the AT2 Receptor (AT2R) in the fetal kidney has anti-proliferative actions in the renomedullary interstitial cells and acts to mediate apoptosis [86]. All these processes are of crucial importance in determining the final number of nephrons per kidney, which is directly correlated with renal function in adulthood. Nephrogenesis is essentially antenatal [87], between the 5th and 36th GW, but more particularly between the 17th and 32nd GW, resulting in a total number of nephrons in humans between 300,000 and 1.1 million [88]. From studies carried out on autopsies or donor kidneys, it is known that there is a sexual dimorphism in renal measurements in adulthood, both in absolute values and in relative values in relation to the body surface area, with significantly higher values in men [89,90]. This implies that the number of total nephrons could be higher in males than in females, although this has not been formally proven in the human species. Interestingly, this sexual dimorphism arises early during nephrogenesis, since differences in renal volume have been found in ultrasound measurements in the fetus during the third trimester of pregnancy, as well as in infants up to 4 years of age [91–93]. On the other hand, no sexual dimorphism was found in terms of nephron counts in the neonatal period [94], but these data have been scarcely studied, on very small cohorts. Renal ontogeny in the mouse is relatively similar to that of the human species, with the succession of three structures, pronephros from the 8th day of gestation (E8), mesonephros from E9, and the metanephros from E11. The main difference is that in the murine species, nephrogenesis continues postnatally until the end of the first week of life. Moreover, sexual dimorphism in renal volume does not exist in the neonatal period in mice [95], which is possibly related to this delay in the acquisition of new nephrons. However, it appears significantly, concomitantly with histological structural changes, starting from the 50th day of life, i.e., after the onset of puberty in mice [95]. A direct effect of testosterone on renal volume has been demonstrated in mouse models of young castrated males secondarily exposed to testosterone or vehicle [96]. The trophic effect of testosterone on organ development, including the kidney, has also been demonstrated in human clinical studies [97]. Thus, sexual dimorphism in renal organogenesis as early as the third trimester in the human species could be related to testosterone secretion by male fetuses in utero [98]. Studies of prenatal exposure to testosterone have shown that the developing kidney is sensitive to testosterone [99], but its implication on renal development under physiological conditions in the fetus, as well as the molecular interaction between androgen signaling pathway and other signaling pathways implicated in nephrogenesis, remain to be further demonstrated.

7. Particularities of Mineralocorticoid and Glucocorticoid Signalings during Renal Development

Kidneys are important tissue targets of corticosteroid signaling pathways and play a crucial role in the neonatal period. Human neonates present with impaired sodium and water reabsorption during the first months of life, which is related to a partial tubular resistance to aldosterone [65] accompanied by high plasma aldosterone levels during the first months of life with progressive normalization to adult values [10]. Our group has shown that this transient and partial resistance to aldosterone in full-term healthy newborns is related to low tubular MR expression at birth, whereas MR is transiently expressed in the fetal kidney between the 14th and 24th GW [65]. Perinatal down-regulation of renal MR expression is not specific to the kidney, as it is also found in other mineralocorticoid target tissues such as the heart and the brain at variance with the lungs where MR expression is maintained at birth [100]. Interestingly, this temporal and tissue-specific expression of mineralocorticoid signaling is found both in mice and humans, demonstrating a well-conserved mechanism that may have a crucial role in the adaptation from aquatic in utero life to terrestrial life [65]. This variation in MR expression is not related to high

aldosterone secretion at birth, since aldosterone synthase knockout mice present with the same neonatal down-regulation of renal MR expression [101]. However, all other players of the mineralocorticoid signaling pathway follow the same biphasic pattern of expression, such as the 11β HSD2 or the α ENaC [65]. Interestingly, the down-regulation of 11β HSD2 in the kidney is not found in the placenta, where its expression is high during the prenatal period to protect the fetus against excessive impregnation by maternal glucocorticoids [66]. Although the mineralocorticoid signaling pathway is down-regulated during the perinatal period, the expression of GR is detected in renal tubular cells, and plasma cortisol levels are detectable in physiological amounts in newborns [66]. Given that 11β HSD2 is not detected, the renal glucocorticoid pathway is activated and cannot be regulated, thus supporting the idea of an equilibrium between mineralocorticoid and glucocorticoid signaling pathways during this specific period of development (Figure 2). To summarize, mineralocorticoid and glucocorticoid signaling pathways are tightly regulated during fetal life and exhibit cyclic periods of high and low activation, depending on the developmental stage. Mineralocorticoid signaling transiently decreases around the perinatal period whereas glucocorticoid secretion is low between 14 and 24 GW and increases exponentially prior to birth. Cyclic impregnation in mineralocorticoids and glucocorticoids seems to be part of the adaptation process to the extra uterine life.

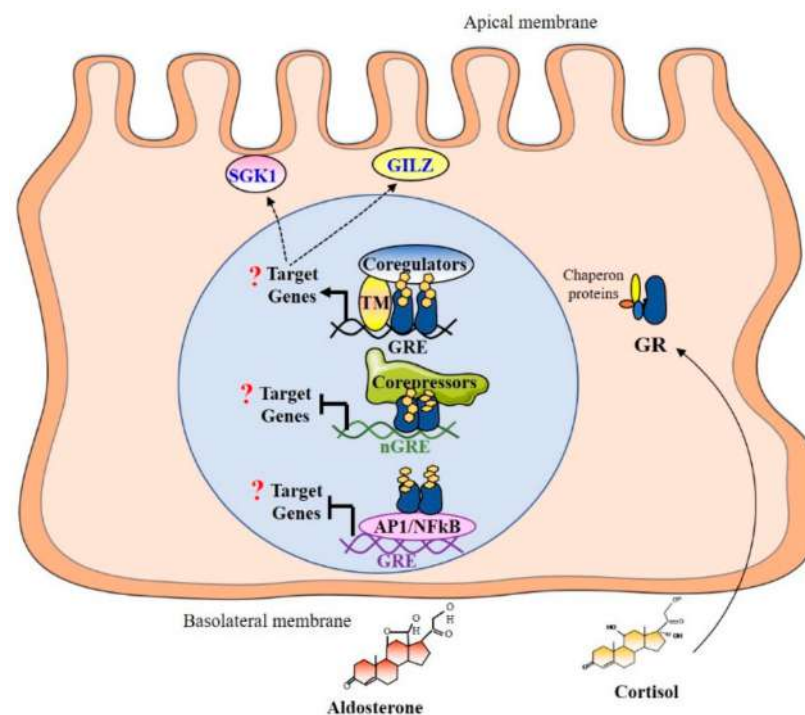


Figure 2. Mineralocorticoid and glucocorticoid signaling in renal principal cell during the perinatal period. MR signaling pathway is ineffective during renal development due to the down-regulation of MR expression. Given that renal 11β HSD2 is not expressed during this specific perinatal period, the GR signaling pathway is therefore functional. In the nucleus, the GR can bind specific sequences called Glucocorticoid Response Elements (GREs). Binding to the GRE activates the recruitment of chromatin-remodeling complexes and coregulators. Negative GRE (nGRE) were also reported, which are responsible for trans-repression of the target genes through the binding of GR monomers. Binding to nGRE prevents the dimerization and allows for the recruitment of corepressors, thus preventing the transcription of target genes. GR can also mediate trans-repression of target genes by tethering via interactions with other transcription factors as NF κ B or AP-1 without direct binding to DNA. GR: Glucocorticoid Receptor; GRE: Glucocorticoid Response Element; GILZ: Glucocorticoid-induced leucine zipper; SGK1: Serum and Glucocorticoid-Regulated kinase 1; PER 1: clock gene period 1; TM: Transcriptional Machinery.

8. Sexual Dimorphism in the Equilibrium between Renal Mineralocorticoid and Glucocorticoid Signaling

Several non-reproductive biological processes have a sexual dimorphic regulation. Blood pressure is one of the most well-recognized, with a differential of approximately 15 mmHg between systolic blood pressure in men and women before menopause [102]. This higher systolic blood pressure in males is conserved in all mammals, suggesting well-preserved regulatory mechanisms [103]. In adults, a direct effect of testosterone on blood pressure levels has been demonstrated in multiple animal models with castration and testosterone substitution experiments [104], whereas ovariectomy had no effect on blood pressure in female rats [105]. Sex steroids are known to influence the activity of the RAS in adults: testosterone promotes the action of Ang II via AT1R, whereas estrogen decreases the AT1R/AT2R ratio inducing a different receptivity to Ang II [103]. Our group observed a sex and organ-specific regulation of target genes of the corticosteroid signaling pathway in adult mice, along with a higher expression of renal 11 β HSD2 in female mice, promoting the selectivity of aldosterone for its receptor [77]. This increased activation of the mineralocorticoid pathway in females does not increase blood pressure but could be aimed at a finer regulation of potassium excretion by distal tubules, which is an adaptive mechanism optimized for maternal–fetal homeostasis during pregnancy [106]. Of particular interest, Zheng et al., reported that the effects of aldosterone on plasma K⁺ were enhanced in females compared with males. These authors demonstrated that both Estrogen Receptors (ER α and ER β) contributed to the estrogen-induced decrease in plasma K⁺ and AT1R binding in ovariectomized female rats [107]. Data in the developing fetus and newborn are less extensive. While no difference in *CYP11B1* and *CYP11B2* gene expressions or steroid concentrations of aldosterone and cortisol/corticosterone has been reported between male and female fetuses during development or at birth, sex specific MR and 11 β HSD2 expression have been demonstrated [77]. Our group reported a sexual dimorphism in renal expression of the MR and its target genes during the perinatal period, with a peak in MR, GR, and mRNA expression of target genes at 17.5 days of gestation in female mice but not in males. These data are consistent with a previous study of Codon et al., showing a greater activity of the 11 β HSD2 in female fetal kidney at 15 days of gestation [108]. It appears that in mice, the imbalance between MR and GR signaling pathways in the kidney during the prenatal period promotes mineralocorticoid signaling in females. This could confer an adaptive advantage for females, particularly in the lung, allowing the resorption of pulmonary fluid at birth by increased expression of α ENaC [100]. Thus, the expression profile found in males could be interpreted as unfavorable and correlated with the greater morbidity presented by boys at birth, particularly in terms of respiratory adaptation [101]. Moreover, this suggests that the glucocorticoid signaling pathway may be preferentially activated in males, who may then be prone to pathological developmental programming following exposure to stress or glucocorticoids during gestation.

9. Consequences in Pathophysiology

Given the imbalance between glucocorticoid and mineralocorticoid signaling pathways between males and females during the perinatal period, it is possible that this may have an impact under certain pathophysiological conditions, with a higher susceptibility for males to develop long term consequences. The “Developmental Origins of Health and Disease” hypothesis has caused resurgence of interest in understanding the factors regulating fetal development. A variety of prenatal perturbations may be involved in the onset of diseases in adulthood including cardiovascular and renal diseases. Our hypothesis is enforced by the existence of a gender difference in the incidence of cardiovascular diseases, such as high blood pressure and heart failure [109,110], which may be the consequence of early perinatal events [111].

Fetal Growth Restriction

In humans, excess of maternal glucocorticoids causes a fetal growth restriction and a higher risk of hypertension later in life [112,113]. Studies (reviewed in [114]) using

animal models (sheep, mouse, and rat models) of fetal growth restriction such as maternal glucocorticoid exposure, maternal calorie or protein restriction, and uteroplacental insufficiency, resulting either in a reduction in 11 β HSD2 placental expression or direct fetal overexposure to glucocorticoids [115] (possibly inducing an overactivation of renal glucocorticoid signaling pathway) have identified alterations in kidney development as being a common feature. Interestingly, in many animal models of developmental programming, there is a sexual dimorphism between males and females in the timing of onset and severity of disease outcomes. Actually, the same prenatal insult does not always affect males and females similarly or to the same degree [114]. The formation of a low nephron endowment may result in impaired renal function and in turn may contribute to disease. These animal models develop programmed hypertension partially due to altered kidney development, resulting in a permanent reduction in offspring nephron endowment [116]. In humans, the number of nephrons is correlated with birth weight, with an estimated gain of approximately 237,426 nephrons per kilogram of additional birth weight, but it is more marked in males [117], which may lead to a differential developmental programming of hypertension between males and females. Importantly, the period of nephrogenesis varies among species with human and sheep completing nephron formation prior to birth, while rodents continue this developmental process after birth [116]. This means both the prenatal and postnatal environment can affect nephron endowment in the mouse. Aside from nephron endowment, modifications in the expression of different players of the corticosteroid signaling pathways have been demonstrated in these models [114], which are not always in association with a reduction in nephron number, thus suggesting that other mechanisms are implicated in developmental programming of high blood pressure [118]. AT1R and AT2R, which are expressed in the kidney early during gestation, have a sexually dimorphic altered expression in animal models of excessive glucocorticoid fetal impregnation, usually resulting in an increased expression of AT1R in males, depending on the timing of the prenatal insult [114]. Preliminary results from our group also suggest a decreased expression in renal MR expression under perinatal glucocorticoid overexposure, with the development of early hypertension, particularly in males.

- *Prematurity*

Preterm birth is associated with increased risks of mortality and morbidity [119]. Studies in preterm infants have demonstrated that males have higher risks of morbidities including respiratory distress syndrome, late-onset sepsis, bronchopulmonary dysplasia, and intraventricular hemorrhage, than females [120] and long term neurological consequences [121]. In addition, former preterm infants have a higher risk of developing early hypertension in adult life [122], particularly for preterm boys [123]. These sex differences are not linked to a variability in HPA axis function [33], but they may be in relation with a higher sensitivity to the administration of antenatal corticosteroids in boys [124]. In a model of lipopolysaccharide-induced prematurity, generated by our group, we observed that former preterm males develop significant hypertension in adulthood [125]. This hypertension is associated with early changes in the expression of different players of the corticosteroid signaling pathway during the neonatal period. Indeed, premature mice exhibited a very strong organ-specific renal activation of the expression of corticosteroid target genes (ENac, Sgk1, and Gilz), which contrasts with a significant decrease in renal MR expression. This suggests GR activation by glucocorticoids, which may program renal functional or molecular alterations, leading to hypertension in adulthood. The developmental programming of hypertension has been described by Barker et al. [126], and the mechanisms invoked were mainly nephron endowment, leading to compensatory hyperfiltration of existing nephrons with glomerulosclerosis and proteinuria in adulthood [127]. Few studies have demonstrated a sexual dimorphism in this prematurity-induced nephron reduction in humans, but no differences had been demonstrated in mice [128]. In our model, formerly premature male mice developed hypertension, independently from nephron number reduction in adulthood, suggesting other pathophysiological mechanisms involved. In addition, a study in humans suggested that the programming of hypertension could be transmitted to the children of

former preterm infants; however, the small sample size did not allow distinguishing a sexual dimorphism [129]. In our mouse model, we identified a transmission of blood pressure dysregulation to subsequent generations from preterm neonates, up to the third generation. Interestingly, this vascular anomaly was only transmitted in males in the second and third generation, which is associated with a significant increase in expression of the corticosteroid target gene *Gilz* and a global hypomethylation of its promoter [125]. This study demonstrates that a predisposition to arterial hypertension could be epigenetically programmed in males by events occurring during the perinatal period in previous generations through sexually dimorphic adverse activation of the corticosteroid signaling pathway.

- *Transient Pseudo-Hypoaldosteronism*

During the early postnatal period, renal mineralocorticoid and glucocorticoid imbalance can also be challenged by urinary infection. Indeed, in case of upper urinary tract infection (pyelonephritis) with or without underlying uropathy, a transient, non-physiological pseudo-hypoaldosteronism may appear [130]. It results in hyponatremia, hyperkalemia, metabolic acidosis, and severe dehydration with major urinary sodium loss, requiring sodium supplementation in the acute phase. Transient pseudo-hypoaldosteronism has the particularity to occur mainly in infants under 3 months of age, in relation to the low renal MR expression at this period of development [65] and in 88% of the cases in males [130]. The pathophysiology may be related to inflammation (through the activation of NF- κ B factor) that further downregulates MR expression and activation [131]. As MR expression is lower in males during the perinatal period [77], they appear more sensitive to a decline in its expression. In addition, the rise in glucocorticoid secretion induced by inflammation may trigger an overactivation of renal GR in males (that have lower 11 β HSD2 levels) and induce alternative adverse effects. Overall, early perinatal events that will challenge renal corticosteroid signaling pathway may trigger short term and long term consequences in a gender-dependent manner. Figure 3 summarizes such renal corticosteroid imbalance between biological sexes and related disorders throughout development.

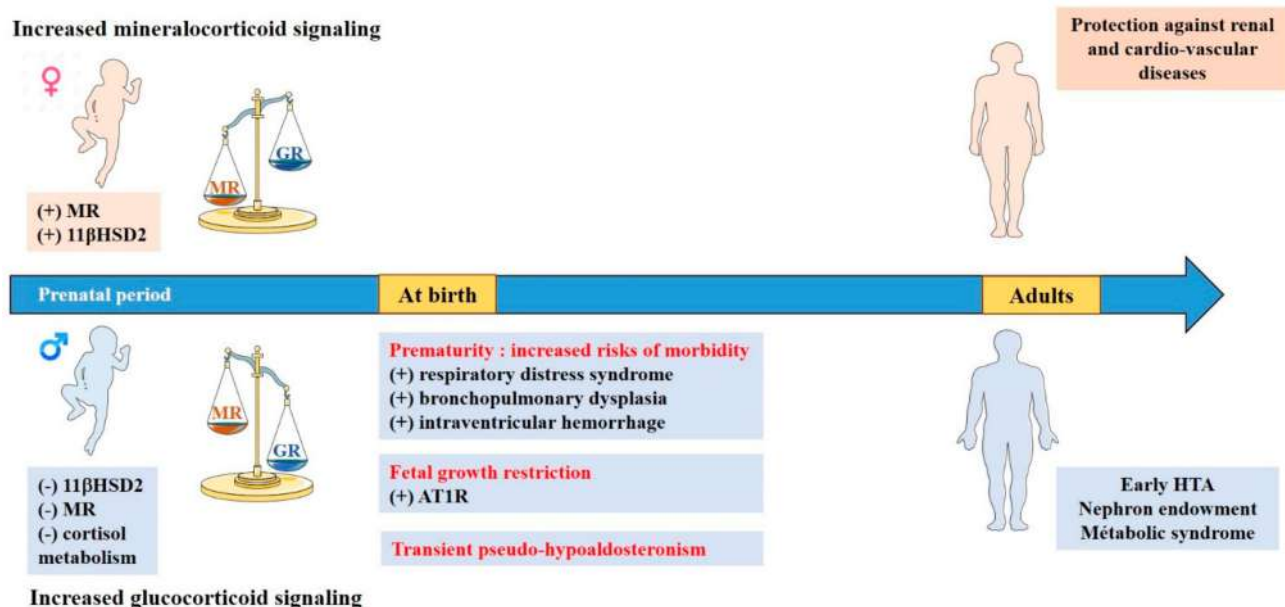


Figure 3. Sexual dimorphism of corticosteroid signaling during kidney development and consequences in pathophysiology. Sexual dimorphism of corticosteroid signaling is effective as early as the perinatal period with higher MR expression and 11 β HSD2 activity in females and higher cortisol metabolism in males, thus favoring mineralocorticoid signaling in female fetus and neonates, and preferential activation of the glucocorticoid pathway in males. These imbalances may have an impact under certain pathophysiological conditions with a higher susceptibility for males to develop short and long term consequences after exacerbated activation of perinatal glucocorticoid signaling pathway.

10. Conclusions

In summary, this review aimed at demonstrating the existence of a temporal window during renal development with a specific and temporal imbalance in glucocorticoid and mineralocorticoid signaling activation, along with a sexual dimorphic regulation. This sex-differential expression and activation of renal corticosteroid signaling pathways in the mammalian fetus and neonate, conserved among species, appear to favor mineralocorticoid signaling in females and glucocorticoid signaling in males. These differences may arise from direct or indirect effects of sex steroids; however, other mechanisms are likely to be at stake. Deciphering such regulatory mechanisms may shed light on short term and long term pathophysiological consequences, markedly for males, and contribute to improve the prevention and management of sex dimorphic diseases such as early hypertension.

Author Contributions: Writing, review, and editing by M.L. (Margaux Laulhé), L.D., T.A.V., I.H., E.P., M.L. (Marc Lombès), S.V. and L.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (Inserm), the Paris-Saclay University, and the French National Agency for Research (ANR), grant no. ANR-20-CE14-0015 (PERIMIRE). The authors would like to thank the French National Network for Rare Endocrine Diseases FIRENDO (www.firendo.fr, accessed on 11 December 2018), supported by the Ministry of Health as part of the 3rd National Plan for Rare Diseases (2018–2022), for providing financial support for the publication of this article.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research.

References

- Seccia, T.M.; Caroccia, B.; Gomez-Sanchez, E.P.; Gomez-Sanchez, C.E.; Rossi, G.P. The Biology of Normal Zona Glomerulosa and Aldosterone-Producing Adenoma: Pathological Implications. *Endocr. Rev.* **2018**, *39*, 1029–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miller, W.L. Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 771–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lefebvre, H.; Duparc, C.; Naccache, A.; Lopez, A.-G.; Castanet, M.; Louiset, E. Paracrine Regulation of Aldosterone Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. *Vitam. Horm.* **2019**, *109*, 303–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wils, J.; Duparc, C.; Cailleux, A.-F.; Lopez, A.-G.; Guiheneuf, C.; Boulet, I.; Boyer, H.-G.; Dubessy, C.; Cherifi, S.; Cauliez, B.; et al. The Neuropeptide Substance P Regulates Aldosterone Secretion in Human Adrenals. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- MacKenzie, S.M.; van Kralingen, J.C.; Davies, E. Regulation of Aldosterone Secretion. *Vitam. Horm.* **2019**, *109*, 241–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Clark, B.J. ACTH Action on StAR Biology. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*, 547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Melau, C.; Nielsen, J.E.; Frederiksen, H.; Kilcoyne, K.; Perlman, S.; Lundvall, L.; Langhoff Thuesen, L.; Juul Hare, K.; Andersson, A.-M.; Mitchell, R.T.; et al. Characterization of Human Adrenal Steroidogenesis During Fetal Development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 1802–1812. [[CrossRef](#)]
- Naccache, A.; Louiset, E.; Duparc, C.; Laquerrière, A.; Patrier, S.; Renouf, S.; Gomez-Sanchez, C.E.; Mukai, K.; Lefebvre, H.; Castanet, M. Temporal and Spatial Distribution of Mast Cells and Steroidogenic Enzymes in the Human Fetal Adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2016**, *434*, 69–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Johnston, Z.C.; Bellingham, M.; Filis, P.; Soffientini, U.; Hough, D.; Bhattacharya, S.; Simard, M.; Hammond, G.L.; King, P.; O’Shaughnessy, P.J.; et al. The Human Fetal Adrenal Produces Cortisol but No Detectable Aldosterone throughout the Second Trimester. *BMC Med.* **2018**, *16*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Martinerie, L.; Pussard, E.; Yousef, N.; Cosson, C.; Lema, I.; Hussein, K.; Mur, S.; Lombès, M.; Boileau, P. Aldosterone-Signaling Defect Exacerbates Sodium Wasting in Very Preterm Neonates: The Premaldo Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 4074–4081. [[CrossRef](#)]
- Ishimoto, H.; Jaffe, R.B. Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. *Endocr. Rev.* **2011**, *32*, 317–355. [[CrossRef](#)]
- Abdel Mohsen, A.H.; Taha, G.; Kamel, B.A.; Maksood, M.A. Evaluation of Aldosterone Excretion in Very Low Birth Weight Infants. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* **2016**, *27*, 726–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Viengchareun, S.; Le Menuet, D.; Martinerie, L.; Munier, M.; Pascual-Le Tallec, L.; Lombès, M. The Mineralocorticoid Receptor: Insights into Its Molecular and (Patho)Physiological Biology. *Nucl. Recept. Signal.* **2007**, *5*, e012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Fan, Y.S.; Eddy, R.L.; Byers, M.G.; Haley, L.L.; Henry, W.M.; Nowak, N.J.; Shows, T.B. The Human Mineralocorticoid Receptor Gene (MLR) Is Located on Chromosome 4 at Q31.2. *Cytogenet. Cell Genet.* **1989**, *52*, 83–84. [[CrossRef](#)]
15. Morrison, N.; Harrap, S.B.; Arriza, J.L.; Boyd, E.; Connor, J.M. Regional Chromosomal Assignment of the Human Mineralocorticoid Receptor Gene to 4q31.1. *Hum. Genet.* **1990**, *85*, 130–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zennaro, M.C.; Keightley, M.C.; Kotelevtsev, Y.; Conway, G.S.; Soubrier, F.; Fuller, P.J. Human Mineralocorticoid Receptor Genomic Structure and Identification of Expressed Isoforms. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21016–21020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lema, I.; Amazit, L.; Lamribet, K.; Fagart, J.; Blanchard, A.; Lombès, M.; Cherradi, N.; Viengchareun, S. HuR-Dependent Editing of a New Mineralocorticoid Receptor Splice Variant Reveals an Osmoregulatory Loop for Sodium Homeostasis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 4835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zennaro, M.C.; Souque, A.; Viengchareun, S.; Poisson, E.; Lombès, M. A New Human MR Splice Variant Is a Ligand-Independent Transactivator Modulating Corticosteroid Action. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 1586–1598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pascual-Le Tallec, L.; Demange, C.; Lombès, M. Human Mineralocorticoid Receptor A and B Protein Forms Produced by Alternative Translation Sites Display Different Transcriptional Activities. *Eur. J. Endocrinol.* **2004**, *150*, 585–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zennaro, M.C.; Le Menuet, D.; Lombès, M. Characterization of the Human Mineralocorticoid Receptor Gene 5'-Regulatory Region: Evidence for Differential Hormonal Regulation of Two Alternative Promoters via Nonclassical Mechanisms. *Mol. Endocrinol.* **1996**, *10*, 1549–1560. [[CrossRef](#)]
21. Le Menuet, D.; Zennaro, M.C.; Viengchareun, S.; Lombès, M. Transgenic Mouse Models to Study Human Mineralocorticoid Receptor Function in Vivo. *Kidney Int.* **2000**, *57*, 1299–1306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Viengchareun, S.; Kamenicky, P.; Teixeira, M.; Butlen, D.; Meduri, G.; Blanchard-Gutton, N.; Kurschat, C.; Lanel, A.; Martinerie, L.; Sztal-Mazer, S.; et al. Osmotic Stress Regulates Mineralocorticoid Receptor Expression in a Novel Aldosterone-Sensitive Cortical Collecting Duct Cell Line. *Mol. Endocrinol.* **2009**, *23*, 1948–1962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Viengchareun, S.; Lema, I.; Lamribet, K.; Keo, V.; Blanchard, A.; Cherradi, N.; Lombès, M. Hypertonicity Compromises Renal Mineralocorticoid Receptor Signaling through Tis11b-Mediated Post-Transcriptional Control. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2014**, *25*, 2213–2221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lema, I.; Amazit, L.; Lamribet, K.; Fagart, J.; Blanchard, A.; Lombès, M.; Cherradi, N.; Viengchareun, S. RNA-Binding Protein HuR Enhances Mineralocorticoid Signaling in Renal KC3AC1 Cells under Hypotonicity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 4587–4597. [[CrossRef](#)]
25. Frederick, M.I.; Heinemann, I.U. Regulation of RNA Stability at the 3' End. *Biol. Chem.* **2021**, *402*, 425–431. [[CrossRef](#)]
26. Ozbaki-Yagan, N.; Liu, X.; Bodnar, A.J.; Ho, J.; Butterworth, M.B. Aldosterone-Induced MicroRNAs Act as Feedback Regulators of Mineralocorticoid Receptor Signaling in Kidney Epithelia. *FASEB J.* **2020**, *34*, 11714–11728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Faresse, N. Post-Translational Modifications of the Mineralocorticoid Receptor: How to Dress the Receptor According to the Circumstances? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *143*, 334–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Busada, J.T.; Cidlowski, J.A. Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development. In *Current Topics in Developmental Biology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 125, pp. 147–170. ISBN 978-0-12-802172-9.
29. Morsi, A.; DeFranco, D.; Witchel, S.F. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Fetus. *Horm. Res. Paediatr.* **2018**, *89*, 380–387. [[CrossRef](#)]
30. Van der Voorn, B.; Hollanders, J.J.; Ket, J.C.F.; Rotteveel, J.; Finken, M.J.J. Gender-Specific Differences in Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Activity during Childhood: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biol. Sex Differ.* **2017**, *8*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Van Keulen, B.J.; Dolan, C.V.; van der Voorn, B.; Andrew, R.; Walker, B.R.; Hulshoff Pol, H.; Boomsma, D.I.; Rotteveel, J.; Finken, M.J.J. Sexual Dimorphism in Cortisol Metabolism throughout Pubertal Development: A Longitudinal Study. *Endocr. Connect.* **2020**, *9*, 542–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Carpenter, T.; Grecian, S.M.; Reynolds, R.M. Sex Differences in Early-Life Programming of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Humans Suggest Increased Vulnerability in Females: A Systematic Review. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2017**, *8*, 244–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Van Keulen, B.J.; Romijn, M.; van der Voorn, B.; de Waard, M.; Hartmann, M.F.; van Goudoever, J.B.; Wudy, S.A.; Rotteveel, J.; Finken, M.J.J. Sex-Specific Differences in HPA Axis Activity in VLBW Preterm Newborns. *Endocr. Connect.* **2021**, *10*, 214–219. [[CrossRef](#)]
34. Finken, M.J.; Andrews, R.C.; Andrew, R.; Walker, B.R. Cortisol Metabolism in Healthy Young Adults: Sexual Dimorphism in Activities of A-Ring Reductases, but Not 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 3316–3321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wudy, S.A.; Hartmann, M.F.; Remer, T. Sexual Dimorphism in Cortisol Secretion Starts after Age 10 in Healthy Children: Urinary Cortisol Metabolite Excretion Rates during Growth. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *293*, E970–E976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Toogood, A.A.; Taylor, N.F.; Shalet, S.M.; Monson, J.P. Sexual Dimorphism of Cortisol Metabolism Is Maintained in Elderly Subjects and Is Not Oestrogen Dependent. *Clin. Endocrinol.* **2000**, *52*, 61–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Vitellius, G.; Trabado, S.; Bouligand, J.; Delemer, B.; Lombès, M. Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Ann. d'Endocrinol.* **2018**, *79*, 98–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kadmiel, M.; Cidlowski, J.A. Glucocorticoid Receptor Signaling in Health and Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 518–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ramos-Ramírez, P.; Tliba, O. Glucocorticoid Receptor β (GR β): Beyond Its Dominant-Negative Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Nicolaides, N.C.; Charmandari, E. Crousos Syndrome: From Molecular Pathogenesis to Therapeutic Management. *Eur. J. Clin. Investig.* **2015**, *45*, 504–514. [[CrossRef](#)]
41. Turner, J.D.; Muller, C.P. Structure of the Glucocorticoid Receptor (NR3C1) Gene 5' Untranslated Region: Identification, and Tissue Distribution of Multiple New Human Exon 1. *J. Mol. Endocrinol.* **2005**, *35*, 283–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lu, N.Z.; Cidlowski, J.A. Translational Regulatory Mechanisms Generate N-Terminal Glucocorticoid Receptor Isoforms with Unique Transcriptional Target Genes. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 331–342. [[CrossRef](#)]
43. Binart, N.; Lombes, M.; Rafestin-Oblin, M.E.; Baulieu, E.E. Characterization of Human Mineralocorticosteroid Receptor Expressed in the Baculovirus System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10681–10685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lombès, M.; Binart, N.; Delahaye, F.; Baulieu, E.E.; Rafestin-Oblin, M.E. Differential Intracellular Localization of Human Mineralocorticosteroid Receptor on Binding of Agonists and Antagonists. *Biochem. J.* **1994**, *302*, 191–197. [[CrossRef](#)]
45. Cheung, J.; Smith, D.F. Molecular Chaperone Interactions with Steroid Receptors: An Update. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 939–946. [[CrossRef](#)]
46. Suren, T.; Rutz, D.; Mößmer, P.; Merkel, U.; Buchner, J.; Rief, M. Single-Molecule Force Spectroscopy Reveals Folding Steps Associated with Hormone Binding and Activation of the Glucocorticoid Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 11688–11693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Arriza, J.L.; Weinberger, C.; Cerelli, G.; Glaser, T.M.; Handelin, B.L.; Housman, D.E.; Evans, R.M. Cloning of Human Mineralocorticoid Receptor Complementary DNA: Structural and Functional Kinship with the Glucocorticoid Receptor. *Science* **1987**, *237*, 268–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Funder, J.W.; Pearce, P.T.; Smith, R.; Smith, A.I. Mineralocorticoid Action: Target Tissue Specificity Is Enzyme, Not Receptor, Mediated. *Science* **1988**, *242*, 583–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Edwards, C.R.; Stewart, P.M.; Burt, D.; Brett, L.; McIntyre, M.A.; Sutanto, W.S.; de Kloet, E.R.; Monder, C. Localisation of 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase—Tissue Specific Protector of the Mineralocorticoid Receptor. *Lancet* **1988**, *2*, 986–989. [[CrossRef](#)]
50. White, P.C. Alterations of Cortisol Metabolism in Human Disorders. *Horm. Res. Paediatr.* **2018**, *89*, 320–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Bianchetti, L.; Sinar, D.; Depenveiller, C.; Dejaegere, A. Insights into Mineralocorticoid Receptor Homodimerization from a Combined Molecular Modeling and Bioinformatics Study. *Proteins* **2021**. [[CrossRef](#)]
52. Le Billan, F.; Amazit, L.; Bleakley, K.; Xue, Q.-Y.; Pussard, E.; Lhadj, C.; Kolkhof, P.; Viengchareun, S.; Fagart, J.; Lombès, M. Corticosteroid Receptors Adopt Distinct Cyclical Transcriptional Signatures. *FASEB J.* **2018**, *32*, 5626–5639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Le Billan, F.; Khan, J.A.; Lamribet, K.; Viengchareun, S.; Bouligand, J.; Fagart, J.; Lombès, M. Cistrome of the Aldosterone-Activated Mineralocorticoid Receptor in Human Renal Cells. *FASEB J.* **2015**, *29*, 3977–3989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Fuller, P.J.; Yang, J.; Young, M.J. 30 Years of the Mineralocorticoid Receptor: Coregulators as Mediators of Mineralocorticoid Receptor Signalling Diversity. *J. Endocrinol.* **2017**, *234*, T23–T34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Na, W.; Shin, J.Y.; Lee, J.Y.; Jeong, S.; Kim, W.-S.; Yune, T.Y.; Ju, B.-G. Dexamethasone Suppresses JMJD3 Gene Activation via a Putative Negative Glucocorticoid Response Element and Maintains Integrity of Tight Junctions in Brain Microvascular Endothelial Cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 3695–3708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ratman, D.; Vanden Berghe, W.; Dejager, L.; Libert, C.; Tavernier, J.; Beck, I.M.; De Bosscher, K. How Glucocorticoid Receptors Modulate the Activity of Other Transcription Factors: A Scope beyond Tethering. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2013**, *380*, 41–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Chen, L.; Zhang, X.; Zhang, W. Regulation of AENaC Transcription. *Vitam. Horm.* **2015**, *98*, 101–135. [[CrossRef](#)]
58. Feraille, E.; Dizin, E. Coordinated Control of ENaC and Na⁺,K⁺-ATPase in Renal Collecting Duct. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *27*, 2554–2563. [[CrossRef](#)]
59. Lou, Y.; Zhang, F.; Luo, Y.; Wang, L.; Huang, S.; Jin, F. Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase 1 in Sodium Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1307. [[CrossRef](#)]
60. Roy, A.; Al-Qusairi, L.; Donnelly, B.F.; Ronzaud, C.; Marciszyn, A.L.; Gong, F.; Chang, Y.P.C.; Butterworth, M.B.; Pastor-Soler, N.M.; Hallows, K.R.; et al. Alternatively Spliced Proline-Rich Cassettes Link WNK1 to Aldosterone Action. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 3433–3448. [[CrossRef](#)]
61. Boulkroun, S.; Fay, M.; Zennaro, M.-C.; Escoubet, B.; Jaisser, F.; Blot-Chaubaud, M.; Farman, N.; Courtois-Coutry, N. Characterization of Rat NDRG2 (N-Myc Downstream Regulated Gene 2), a Novel Early Mineralocorticoid-Specific Induced Gene. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 31506–31515. [[CrossRef](#)]
62. Robert-Nicoud, M.; Flahaut, M.; Elalouf, J.M.; Nicod, M.; Salinas, M.; Bens, M.; Doucet, A.; Wincker, P.; Artiguenave, F.; Horisberger, J.D.; et al. Transcriptome of a Mouse Kidney Cortical Collecting Duct Cell Line: Effects of Aldosterone and Vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2712–2716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Gumz, M.L.; Stow, L.R.; Lynch, I.J.; Greenlee, M.M.; Rudin, A.; Cain, B.D.; Weaver, D.R.; Wingo, C.S. The Circadian Clock Protein Period 1 Regulates Expression of the Renal Epithelial Sodium Channel in Mice. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 2423–2434. [[CrossRef](#)]
64. Nguyen Dinh Cat, A.; Ouvrard-Pascaud, A.; Tronche, F.; Clemessy, M.; Gonzalez-Nunez, D.; Farman, N.; Jaisser, F. Conditional Transgenic Mice for Studying the Role of the Glucocorticoid Receptor in the Renal Collecting Duct. *Endocrinology* **2009**, *150*, 2202–2210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Martinerie, L.; Viengchareun, S.; Delezoide, A.-L.; Jaubert, F.; Sinico, M.; Prevot, S.; Boileau, P.; Meduri, G.; Lombès, M. Low Renal Mineralocorticoid Receptor Expression at Birth Contributes to Partial Aldosterone Resistance in Neonates. *Endocrinology* **2009**, *150*, 4414–4424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Martinerie, L.; Pussard, E.; Meduri, G.; Delezoide, A.-L.; Boileau, P.; Lombès, M. Lack of Renal 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 at Birth, a Targeted Temporal Window for Neonatal Glucocorticoid Action in Human and Mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ueda, K.; Fujiki, K.; Shirahige, K.; Gomez-Sanchez, C.E.; Fujita, T.; Nangaku, M.; Nagase, M. Genome-Wide Analysis of Murine Renal Distal Convoluted Tubular Cells for the Target Genes of Mineralocorticoid Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *445*, 132–137. [[CrossRef](#)]
68. Liu, L.; Li, A.; Matthews, S.G. Maternal Glucocorticoid Treatment Programs HPA Regulation in Adult Offspring: Sex-Specific Effects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2001**, *280*, E729–E739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Owen, D.; Matthews, S.G. Glucocorticoids and Sex-Dependent Development of Brain Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors. *Endocrinology* **2003**, *144*, 2775–2784. [[CrossRef](#)]
70. Karandrea, D.; Kittas, C.; Kitraki, E. Contribution of Sex and Cellular Context in the Regulation of Brain Corticosteroid Receptors Following Restraint Stress. *Neuroendocrinology* **2000**, *71*, 343–353. [[CrossRef](#)]
71. Kanashiro-Takeuchi, R.M.; Heidecker, B.; Lamirault, G.; Dharamsi, J.W.; Hare, J.M. Sex-Specific Impact of Aldosterone Receptor Antagonism on Ventricular Remodeling and Gene Expression after Myocardial Infarction. *Clin. Transl. Sci.* **2009**, *2*, 134–142. [[CrossRef](#)]
72. Mihailidou, A.S.; Ashton, A.W. Cardiac Effects of Aldosterone: Does Gender Matter? *Steroids* **2014**, *91*, 32–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Barrett Mueller, K.; Lu, Q.; Mohammad, N.N.; Luu, V.; McCurley, A.; Williams, G.H.; Adler, G.K.; Karas, R.H.; Jaffe, I.Z. Estrogen Receptor Inhibits Mineralocorticoid Receptor Transcriptional Regulatory Function. *Endocrinology* **2014**, *155*, 4461–4472. [[CrossRef](#)]
74. Duma, D.; Collins, J.B.; Chou, J.W.; Cidlowski, J.A. Sexually Dimorphic Actions of Glucocorticoids Provide a Link to Inflammatory Diseases with Gender Differences in Prevalence. *Sci. Signal.* **2010**, *3*, ra74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Moisan, M.-P. Sexual Dimorphism in Glucocorticoid Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3139. [[CrossRef](#)]
76. Ayyar, V.S.; DuBois, D.C.; Almon, R.R.; Jusko, W.J. Modeling Corticosteroid Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Part III: Estrous Cycle and Estrogen Receptor-Dependent Antagonism of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ) Enhancement by Corticosteroids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2019**, *370*, 337–349. [[CrossRef](#)]
77. Dumeige, L.; Storey, C.; Decourtye, L.; Nehlich, M.; Lhadji, C.; Viengchareun, S.; Kappeler, L.; Lombès, M.; Martinerie, L. Sex-Specificity of Mineralocorticoid Target Gene Expression during Renal Development, and Long-Term Consequences. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 457. [[CrossRef](#)]
78. Woolf, A.S.; Winyard, P.J.D. Molecular Mechanisms of Human Embryogenesis: Developmental Pathogenesis of Renal Tract Malformations. *Pediatr. Dev. Pathol.* **2002**, *5*, 108–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Gueutin, V.; Deray, G.; Isnard-Bagnis, C. [Renal physiology]. *Bull. Cancer* **2012**, *99*, 237–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Costantini, F. Renal Branching Morphogenesis: Concepts, Questions, and Recent Advances. *Differentiation* **2006**, *74*, 402–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Kitamura, S.; Sakurai, H.; Makino, H. Single Adult Kidney Stem/Progenitor Cells Reconstitute Three-Dimensional Nephron Structures in Vitro. *Stem Cells* **2015**, *33*, 774–784. [[CrossRef](#)]
82. Michos, O. Kidney Development: From Ureteric Bud Formation to Branching Morphogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2009**, *19*, 484–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Patel, S.R.; Dressler, G.R. The Genetics and Epigenetics of Kidney Development. *Semin. Nephrol.* **2013**, *33*, 314–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Dressler, G.R.; Patel, S.R. Epigenetics in Kidney Development and Renal Disease. *Transl. Res.* **2015**, *165*, 166–176. [[CrossRef](#)]
85. Iosipiv, I.V.; Schroeder, M. A Role for Angiotensin II AT1 Receptors in Ureteric Bud Cell Branching. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2003**, *285*, F199–F207. [[CrossRef](#)]
86. Wolf, G. Angiotensin II and Tubular Development. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2002**, *17* (Suppl. S9), 48–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Haycock, G.B. Development of Glomerular Filtration and Tubular Sodium Reabsorption in the Human Fetus and Newborn. *Br. J. Urol.* **1998**, *81* (Suppl. S2), 33–38. [[CrossRef](#)]
88. Nyengaard, J.R.; Bendtsen, T.F. Glomerular Number and Size in Relation to Age, Kidney Weight, and Body Surface in Normal Man. *Anat. Rec.* **1992**, *232*, 194–201. [[CrossRef](#)]
89. Kalucki, S.A.; Lardi, C.; Garessus, J.; Kfoury, A.; Grabherr, S.; Burnier, M.; Pruijm, M. Reference Values and Sex Differences in Absolute and Relative Kidney Size. A Swiss Autopsy Study. *BMC Nephrol.* **2020**, *21*, 289. [[CrossRef](#)]
90. Denic, A.; Mathew, J.; Lerman, L.O.; Lieske, J.C.; Larson, J.J.; Alexander, M.P.; Poggio, E.; Glasscock, R.J.; Rule, A.D. Single-Nephron Glomerular Filtration Rate in Healthy Adults. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 2349–2357. [[CrossRef](#)]

91. Ferdous, F.; Ma, E.; Raqib, R.; Wagatsuma, Y. Birth Weight Influences the Kidney Size and Function of Bangladeshi Children. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2018**, *9*, 386–394. [[CrossRef](#)]
92. Geelhoed, J.J.M.; Taal, H.R.; Steegers, E.A.P.; Arends, L.R.; Lequin, M.; Moll, H.A.; Hofman, A.; van der Heijden, A.J.; Jaddoe, V.W.V. Kidney Growth Curves in Healthy Children from the Third Trimester of Pregnancy until the Age of Two Years. The Generation R Study. *Pediatr. Nephrol.* **2010**, *25*, 289–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Schmidt, I.M.; Main, K.M.; Damgaard, I.N.; Mau, C.; Haavisto, A.-M.; Chellakooty, M.; Boisen, K.A.; Petersen, J.H.; Scheike, T.; Olgaard, K. Kidney Growth in 717 Healthy Children Aged 0–18 Months: A Longitudinal Cohort Study. *Pediatr. Nephrol.* **2004**, *19*, 992–1003. [[CrossRef](#)]
94. Mañalich, R.; Reyes, L.; Herrera, M.; Melendi, C.; Fundora, I. Relationship between Weight at Birth and the Number and Size of Renal Glomeruli in Humans: A Histomorphometric Study. *Kidney Int.* **2000**, *58*, 770–773. [[CrossRef](#)]
95. Okada, A.; Yabuki, A.; Matsumoto, M.; Suzuki, S. Development of Gender Differences in DBA/2Cr Mouse Kidney Morphology during Maturation. *J. Vet. Med. Sci.* **2005**, *67*, 877–882. [[CrossRef](#)]
96. Shortliffe, L.M.D.; Ye, Y.; Behr, B.; Wang, B. Testosterone Changes Bladder and Kidney Structure in Juvenile Male Rats. *J. Urol.* **2014**, *191*, 1913–1919. [[CrossRef](#)]
97. Gagliano-Jucá, T.; Tang, E.R.; Bhasin, S.; Pencina, K.M.; Anderson, S.; Jara, H.; Li, Z.; Melamud, K.; Coleman, S.L.; Aakil, A.; et al. Effects of Testosterone Administration (and Its 5-Alpha-Reduction) on Parenchymal Organ Volumes in Healthy Young Men: Findings from a Dose-Response Trial. *Andrology* **2017**, *5*, 889–897. [[CrossRef](#)]
98. Forest, M.G.; de Peretti, E.; Lecoq, A.; Cadillon, E.; Zabot, M.T.; Thoulon, J.M. Concentration of 14 Steroid Hormones in Human Amniotic Fluid of Midpregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1980**, *51*, 816–822. [[CrossRef](#)]
99. Bábíčková, J.; Borbélyová, V.; Tóthová, L.; Kubišová, K.; Janega, P.; Hodosy, J.; Celec, P. The Renal Effects of Prenatal Testosterone in Rats. *J. Urol.* **2015**, *193*, 1700–1708. [[CrossRef](#)]
100. Martinerie, L.; Munier, M.; Le Menuet, D.; Meduri, G.; Viengchareun, S.; Lombès, M. The Mineralocorticoid Signaling Pathway throughout Development: Expression, Regulation and Pathophysiological Implications. *Biochimie* **2013**, *95*, 148–157. [[CrossRef](#)]
101. Martinerie, L.; Viengchareun, S.; Meduri, G.; Kim, H.-S.; Luther, J.M.; Lombès, M. Aldosterone Postnatally, but Not at Birth, Is Required for Optimal Induction of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression and Sodium Reabsorption. *Endocrinology* **2011**, *152*, 2483–2491. [[CrossRef](#)]
102. Wiinberg, N.; Høegholm, A.; Christensen, H.R.; Bang, L.E.; Mikkelsen, K.L.; Nielsen, P.E.; Svendsen, T.L.; Kampmann, J.P.; Madsen, N.H.; Bentzon, M.W. 24-h Ambulatory Blood Pressure in 352 Normal Danish Subjects, Related to Age and Gender. *Am. J. Hypertens.* **1995**, *8*, 978–986. [[CrossRef](#)]
103. Hilliard, L.M.; Sampson, A.K.; Brown, R.D.; Denton, K.M. The “His and Hers” of the Renin-Angiotensin System. *Curr. Hypertens. Rep.* **2013**, *15*, 71–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Chen, Y.F.; Meng, Q.C. Sexual Dimorphism of Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Is Androgen Dependent. *Life Sci.* **1991**, *48*, 85–96. [[CrossRef](#)]
105. Rowland, N.E.; Fregly, M.J. Role of Gonadal Hormones in Hypertension in the Dahl Salt-Sensitive Rat. *Clin. Exp. Hypertens. A* **1992**, *14*, 367–375. [[CrossRef](#)]
106. Veiras, L.C.; Girardi, A.C.C.; Curry, J.; Pei, L.; Ralph, D.L.; Tran, A.; Castelo-Branco, R.C.; Pastor-Soler, N.; Arranz, C.T.; Yu, A.S.L.; et al. Sexual Dimorphic Pattern of Renal Transporters and Electrolyte Homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 3504–3517. [[CrossRef](#)]
107. Zheng, W.; Shi, M.; You, S.-E.; Ji, H.; Roesch, D.M. Estrogens Contribute to a Sex Difference in Plasma Potassium Concentration: A Mechanism for Regulation of Adrenal Angiotensin Receptors. *Gen. Med.* **2006**, *3*, 43–53. [[CrossRef](#)]
108. Condon, J.; Ricketts, M.L.; Whorwood, C.B.; Stewart, P.M. Ontogeny and Sexual Dimorphic Expression of Mouse Type 2 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1997**, *127*, 121–128. [[CrossRef](#)]
109. Steen, E.E.; Källén, K.; Maršál, K.; Norman, M.; Hellström-Westas, L. Impact of Sex on Perinatal Mortality and Morbidity in Twins. *J. Perinat. Med.* **2014**, *42*, 225–231. [[CrossRef](#)]
110. Sandberg, K.; Ji, H. Sex Differences in Primary Hypertension. *Biol. Sex Differ.* **2012**, *3*, 7. [[CrossRef](#)]
111. Ojeda, N.B.; Intapad, S.; Alexander, B.T. Sex Differences in the Developmental Programming of Hypertension. *Acta Physiol.* **2014**, *210*, 307–316. [[CrossRef](#)]
112. Barker, D.J.; Bull, A.R.; Osmond, C.; Simmonds, S.J. Fetal and Placental Size and Risk of Hypertension in Adult Life. *BMJ* **1990**, *301*, 259–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Barker, D.J.; Winter, P.D.; Osmond, C.; Margetts, B.; Simmonds, S.J. Weight in Infancy and Death from Ischaemic Heart Disease. *Lancet* **1989**, *2*, 577–580. [[CrossRef](#)]
114. Moritz, K.M.; Cuffe, J.S.M.; Wilson, L.B.; Dickinson, H.; Wlodek, M.E.; Simmons, D.G.; Denton, K.M. Review: Sex Specific Programming: A Critical Role for the Renal Renin-Angiotensin System. *Placenta* **2010**, *31*, S40–S46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Cottrell, E.C.; Holmes, M.C.; Livingstone, D.E.; Kenyon, C.J.; Seckl, J.R. Reconciling the Nutritional and Glucocorticoid Hypotheses of Fetal Programming. *FASEB J.* **2012**, *26*, 1866–1874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Moritz, K.M.; Wintour, E.M.; Black, M.J.; Bertram, J.F.; Caruana, G. Factors Influencing Mammalian Kidney Development: Implications for Health in Adult Life. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **2008**, *196*, 1–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Hughson, M.; Farris, A.B.; Douglas-Denton, R.; Hoy, W.E.; Bertram, J.F. Glomerular Number and Size in Autopsy Kidneys: The Relationship to Birth Weight. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 2113–2122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

118. Grigore, D.; Ojeda, N.B.; Alexander, B.T. Sex Differences in the Fetal Programming of Hypertension. *Gen. Med.* **2008**, *5* (Suppl. S1), S121–S132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Harrison, M.S.; Goldenberg, R.L. Global Burden of Prematurity. *Semin. Fetal Neonatal. Med.* **2016**, *21*, 74–79. [[CrossRef](#)]
120. Boghossian, N.S.; Geraci, M.; Edwards, E.M.; Horbar, J.D. Sex Differences in Mortality and Morbidity of Infants Born at Less Than 30 Weeks' Gestation. *Pediatrics* **2018**, *142*. [[CrossRef](#)]
121. Verloove-Vanhorick, S.P.; Veen, S.; Ens-Dokkum, M.H.; Schreuder, A.M.; Brand, R.; Ruys, J.H. Sex Difference in Disability and Handicap at Five Years of Age in Children Born at Very Short Gestation. *Pediatrics* **1994**, *93*, 576–579.
122. De Jong, F.; Monuteaux, M.C.; van Elburg, R.M.; Gillman, M.W.; Belfort, M.B. Systematic Review and Meta-Analysis of Preterm Birth and Later Systolic Blood Pressure. *Hypertension* **2012**, *59*, 226–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Staub, E.; Urfer-Maurer, N.; Lemola, S.; Risch, L.; Evers, K.S.; Welzel, T.; Pfister, M. Comparison of Blood Pressure and Kidney Markers between Adolescent Former Preterm Infants and Term Controls. *Children* **2020**, *7*, 141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Battarbee, A.N.; Glover, A.V.; Vladutiu, C.J.; Gyamfi-Bannerman, C.; Aliaga, S.; Manuck, T.A.; Boggess, K.A. Sex-Specific Differences in Late Preterm Neonatal Outcomes. *Am. J. Perinatol.* **2019**, *36*, 1223–1228. [[CrossRef](#)]
125. Dumeige, L.; Nehlich, M.; Viengchareun, S.; Perrot, J.; Pussard, E.; Lombès, M.; Martinerie, L. Preterm Birth Is Associated with Epigenetic Programming of Transgenerational Hypertension in Mice. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 152–165. [[CrossRef](#)]
126. Barker, D.J. The Fetal and Infant Origins of Adult Disease. *BMJ* **1990**, *301*, 1111. [[CrossRef](#)]
127. Brenner, B.M.; Mackenzie, H.S. Nephron Mass as a Risk Factor for Progression of Renal Disease. *Kidney Int. Suppl.* **1997**, *63*, S124–S127.
128. Stelloh, C.; Allen, K.P.; Mattson, D.L.; Lerch-Gaggl, A.; Reddy, S.; El-Meanawy, A. Prematurity in Mice Leads to Reduction in Nephron Number, Hypertension, and Proteinuria. *Transl. Res.* **2012**, *159*, 80–89. [[CrossRef](#)]
129. Mathai, S.; Derraik, J.G.B.; Cutfield, W.S.; Dalziel, S.R.; Harding, J.E.; Biggs, J.B.; Jefferies, C.; Hofman, P.L. Blood Pressure Abnormalities in Adults Born Moderately Preterm and Their Children. *Int. J. Cardiol.* **2015**, *181*, 152–154. [[CrossRef](#)]
130. Bogdanović, R.; Stajić, N.; Putnik, J.; Paripović, A. Transient Type 1 Pseudo-Hypoaldosteronism: Report on an Eight-Patient Series and Literature Review. *Pediatr. Nephrol.* **2009**, *24*, 2167–2175. [[CrossRef](#)]
131. De Seigneux, S.; Leroy, V.; Ghzili, H.; Rousselot, M.; Nielsen, S.; Rossier, B.C.; Martin, P.-Y.; Féraïlle, E. NF-KappaB Inhibits Sodium Transport via down-Regulation of SGK1 in Renal Collecting Duct Principal Cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 25671–25681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article 4

The Invention of Aldosterone, How the past Resurfaces on Pediatric Endocrinology

Say Viengchareun, Eric Pussard, Mireille Castanet, Laurent M. Sachs, **Thi An Vu**, Pascal Boileau,
Marc Lombès, Laetitia Martinerie.

Molecular and Cellular Endocrinology

Special Issue on “The Adrenal Gland: Development, Function and Tissue Maintenance”



The invention of aldosterone, how the past resurfaces in pediatric endocrinology

Say Viengchareun^a, Eric Pussard^{a,b}, Mireille Castanet^c, Laurent M. Sachs^d, Thi An Vu^a, Pascal Boileau^{a,e}, Marc Lombès^a, Laetitia Martinerie^{a,f,g,*}

^a Université Paris-Saclay, Inserm, Physiologie et Physiopathologie Endocrinienne, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

^b Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 94275, Le Kremlin Bicêtre, France

^c Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1239, CHU Rouen, Department of Pediatrics, F-76000, Rouen, France

^d UMR 7221 Molecular Physiology and Adaption, Department Adaptation of Life, Centre National de La Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

^e Department of Neonatal Pediatrics, Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy-Saint-Germain, 10, Rue du Champ Gaillard 78300 Poissy France; Université Paris-Saclay, UVSQ, 78180, Montigny-Le-Bretonneux, France

^f Université de Paris, 75019, Paris, France

^g Pediatric Endocrinology Department, AP-HP, Hôpital Universitaire Robert-Debre, 75019, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Aldosterone
Mineralocorticoid receptor
Neonates
Human
Amphibian
Fish

ABSTRACT

Sodium and water homeostasis are drastically modified at birth, in mammals, by the transition from aquatic life to terrestrial life. Accumulating evidence during the past ten years underscores the central role for the mineralocorticoid signaling pathway, in the fine regulation of this equilibrium, at this critical period of development. Interestingly, regarding evolution, while the mineralocorticoid receptor is expressed in fish, the appearance of its related ligand, aldosterone, coincides with terrestrial life, as it is first detected in lungfish and amphibian. Thus, aldosterone is likely one of the main hormones regulating the transition from an aquatic environment to an air environment. This review will focus on the different actors of the mineralocorticoid signaling pathway from aldosterone secretion in the adrenal gland, to mineralocorticoid receptor expression in the kidney, summarizing their regulation and roles throughout fetal and neonatal development, in the light of evolution.

1. Introduction

Sodium and water homeostasis are finely regulated by the mineralocorticoid signaling pathway, notably in the distal nephron in mammals. However, this equilibrium is challenged at birth by the transition from intrauterine to extrauterine life. Accumulating evidence suggests that aldosterone may be one of the key regulators for this transition. This review will emphasize the regulation and role of the mineralocorticoid signaling pathway (mainly aldosterone and its receptor, the mineralocorticoid receptor), throughout fetal and neonatal development, in the light of evolution (Ayala, 1977).

2. Sodium and water homeostasis and special features in full-term and preterm newborns

Sodium and water homeostasis constitute the physiological processes

regulating the stability of plasma osmolarity and plasma volume. In humans, sodium balance is regulated by two variables: food inputs, and outputs (renal in majority, and extrarenal in minority, under physiological conditions). The efficiency of renal control of sodium and water balance is based on an equilibrium between the filtered sodium flow (dependent on serum sodium and glomerular filtration rate) and tubular reabsorption of sodium (Devuyst, 2008). The latter is made possible by the joint and coordinated intervention of the different segments of the nephron, contributing to the reabsorption of 99% of the ultrafiltered sodium. The distal parts of the nephron (distal convoluted tubule, connecting duct and collecting duct) are involved in the fine regulation of sodium balance (Palmer and Schnermann, 2015). The effectors of this regulation act in response to stimulation of baroreceptors and volume receptors; these are various neuroendocrine systems including the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), the atrial natriuretic factor, vegetative innervation, or the prostaglandin system. Segments of

* Corresponding author. Inserm U1185, 63, rue Gabriel Péri 94276, Le Kremlin Bicêtre Cedex, France.

E-mail address: laetitia.martinerie@aphp.fr (L. Martinerie).

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111375>

Received 4 March 2021; Received in revised form 22 June 2021; Accepted 24 June 2021

Available online 29 June 2021

0303-7207/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

the nephron expressing the mineralocorticoid receptor (MR) are grouped together under the term Aldosterone Sensitive Distal Nephron (ASDN). The epithelium of the collecting duct is made up of tight intercellular junctions (desmosomes) preventing any extracellular transport. Transcellular sodium reabsorption therefore involves two main transporters: the Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) and the Na⁺/K⁺-ATPase pump. In addition, the principal cells of the collecting duct are also the site of transepithelial water reabsorption thanks to the osmotic force induced by sodium transport. This water reabsorption is mostly ensured by the aquaporic channels: AQP2, expression of which is located at the apical membrane, is induced by vasopressin and also regulated by aldosterone (Hasler et al., 2003) while AQP3 and AQP4 are constitutively expressed at the basolateral membrane. The collecting duct therefore appears to be the site of the final modulation of renal sodium and water reabsorption.

In utero, sodium and water homeostasis are initially regulated in the fetus by the placenta. Kidneys only play an ancillary role, since the absence of a kidney is compatible with a live born infant at full-term (anephric newborn) (Gunn et al., 1988). Glomerular filtration and emission of the first urine begin at the 10th gestational week (GW) contributing to the production of amniotic fluid. The amount of amniotic fluid increases from 25 ml at 10 GW to 400 ml at 20 GW, with a composition similar to that of the fetal plasma. Indeed, prior to skin keratinization, water and solutes diffuse freely between spaces, in a bidirectional manner. The amniotic fluid then serves as a physiological buffer and corresponds to an extension of the extracellular environment of the fetus. Fetal keratinization begins around 14 GW with a phase of follicular keratinization, then continues with a phase of interfollicular keratinization which usually ends at the 25th GW. After this phase of keratinization, the volume and composition of the amniotic fluid become dependent on several levels of regulation (renal production, swallowing of the fetus, oral, esophageal and pulmonary fluids of the fetus, inter and transmembrane transfers), and are then submitted to active exchanges between the different compartments (Underwood et al., 2005). Thus, along with the development of the various functions of the kidneys, composition of the amniotic fluid evolves. Sodium and chlorine concentrations decrease from the second trimester of pregnancy, while urea and creatinine concentrations increase. The overall osmolality of amniotic fluid decreases (Underwood et al., 2005). Around 36 GW, nephrogenesis (formation of new nephrons) is complete, and the kidneys, although still immature, can take over the regulation of sodium and water balance in the fetus.

At birth and in the postnatal period, renal function must adapt to the delicate task of establishing an effective purification function while ensuring the fluid-electrolyte balance. The immaturity of the main renal functions (glomerular and tubular) in the newborn, the disruption of the composition of the internal environment by the physiological changes of transition between the intrauterine aquatic environment and the extrauterine terrestrial environment, and the need to adapt to the requirements of rapid growth, make this phase of adaptation all the more complex. Growth requires the establishment of a positive hydro-electrolyte balance, with inputs greater than outputs. As part of the adjustment to extrauterine life, other important changes are added during the neonatal period. The physiological weight loss observed during the neonatal period (usually up to 5–10% of the body weight) occurs mainly to the detriment of the extracellular compartment. The urine output of full-term newborns is between 1 and 3 ml/kg/h. The reduction of extracellular volume may reach 15% of body weight in premature infants and is associated with a urine output of up to 7 ml/kg/h (Lindower, 2017; Suarez-Rivera and Bonilla-Felix, 2014). Glomerular filtration increases sharply during the first hours of life, however, remains low (20 ml/min/1.73 m²). The glomerular filtration rate is even lower in very premature infants, around 10 ml/min/1.73 m² at birth (Bockenhauer and Zieg, 2014). This partially explains the slow elimination of maternal plasma creatinine levels, which takes only a few days in the full-term newborn, and can reach several weeks in the very

premature infant (van den Anker et al., 1995). The mechanism of concentration/dilution of urine is essential to regulate water balance. The capacity to concentrate urine increases gradually and reaches adult levels around the age of 1 year (Suarez-Rivera and Bonilla-Felix, 2014). Conversely, the power of urine dilution is acquired *in utero*, and does not differ between premature infants, full-term newborns and adults. Under normal physiological conditions, the kidneys of the full-term newborns must excrete the fluid overload acquired during fetal life (Lindower, 2017). Therefore, the ability to concentrate urine is not necessary at birth. However, in premature infants, whose fluid overload is greater and the power of urine concentration weaker, the risk of hydro-electrolyte disorders becomes significant (Bockenhauer and Zieg, 2014; Suarez-Rivera and Bonilla-Felix, 2014).

Renal control of sodium excretion is essential for maintaining blood volume and a positive sodium balance, crucial for normal growth. The fraction of excreted sodium is high at birth but decreases rapidly in full-term newborns and reaches less than 1% (Suarez-Rivera and Bonilla-Felix, 2014). In premature infants, this adaptation takes place more slowly, over 2–3 weeks, especially before 34 GW, where the fraction of excreted sodium can reach 3–5% and often requires systematic sodium supplementation (Suarez-Rivera and Bonilla-Felix, 2014). The full-term newborn retains about 30% of the sodium ingested, however cannot excrete excess sodium or water load. This ability is not acquired until the end of the first year of life (Zoetis and Hurtt, 2003). All of these maturation processes of renal function are integrated with the development of the different structures of the kidney (Zoetis and Hurtt, 2003) and the progressive expression of the different players (hormone receptors, ion channels and transporters) of the regulation of sodium and water balance, in particular of the mineralocorticoid signaling pathway.

3. The mineralocorticoid signaling pathway

The first step in the activation of the mineralocorticoid signaling pathway is characterized by the biosynthesis and secretion of the steroid hormone aldosterone, which is the predominant mineralocorticoid hormone in mammals. This hormone is synthesized in the *zona glomerulosa* (ZG) of the adrenal cortex.

3.1. Aldosterone biosynthesis, secretion, and regulation

The pathway of human aldosterone biosynthesis by the ZG is now well understood. The ZG is the outermost layer of the adrenal cortex, lying just beneath the fibrous capsule and composed of clustered cells that uniquely express aldosterone synthase (CYP11B2), the steroidogenic enzyme encoded by the *CYP11B2* gene that performs the final stages of aldosterone production. Beneath the ZG, lies the *zona fasciculata* (ZF), and, underneath, the *zona reticularis* (ZR), which produces glucocorticoids and adrenal androgens, respectively (Seccia et al., 2018).

The first step in steroidogenesis takes place within mitochondria that contains very little cholesterol. The steroidogenic acute regulatory protein, StAR (encoded by the *STAR* gene) ensures cholesterol import from the outer to the inner mitochondrial membrane. This mitochondrial translocation is the rate-limiting step in steroidogenesis. Then, the mitochondrial enzyme, cytochrome P450_{scc} (encoded by the *CYP11A1* gene) cleaves cholesterol sidechain to produce pregnenolone. Subsequent conversion of pregnenolone to progesterone is catalyzed by the type 2 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/d Δ 5- Δ 4 isomerase, encoded by the *HSD3B2* gene and located in the membrane of the endoplasmic reticulum. As the adrenal ZG does not express P450_{c17}, progesterone is 21-hydroxylated into 11-deoxycorticosterone (DOC) by the microsomal P450_{c21} encoded by the *CYP21A2* gene. The restricted expression of aldosterone synthase (P450_{c11AS} encoded by the *CYP11B2* gene, located at 8q22 in humans, and comprising 9 exons and over 7000 base pairs (Bassett et al., 2004) ensures zonal control of aldosterone secretion

in ZG. *CYP11B2* gene locates in tandem with the highly homologous *CYP11B1* gene, which encodes the 11β -hydroxylase enzyme essential to cortisol synthesis in ZF. Nevertheless, *CYP11B1* gene and *CYP11B2* are never commonly coexpressed and P450c11AS sequentially catalyzes 11-hydroxylase, 18-hydroxylase and 18-methyl oxidase activities in ZG, yielding successively to corticosterone, 18-hydroxycorticosterone and finally aldosterone (Miller and Auchus, 2011).

As the adrenal ZG has no capacity to store aldosterone once it is produced, the regulation of the secretion is inextricably linked to transcriptional activation as well as posttranscriptional modification of steroidogenic enzymes. Acute aldosterone production is controlled by the early regulatory step of cholesterol uptake and conversion to pregnenolone that is mediated by increased expression and phosphorylation of StAR. A late regulatory step controlling the expression of biosynthesis enzymes, particularly *CYP11B2*, regulates chronic aldosterone production. Aldosterone biosynthesis in the ZG is physiologically regulated by angiotensin II (Ang II), potassium (K^+), and at a lesser extent by the adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Membrane depolarization and increase in intracellular calcium levels are the most important determinants of aldosterone secretion (Fig. 1). The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is initiated by various stimuli such as increased sympathetic activity, reduced perfusion pressure in the renal afferent arterioles or decreased sodium content facing the *macula densa* of the renal distal tubules that release renin from juxtaglomerular cells. Afterward, renin converts angiotensinogen to angiotensin I, which is subsequently cleaved by Angiotensin Converting Enzyme (ACE) to form the octapeptide Ang II. Binding of Ang II to its AT1 receptor activates phospholipase C, and, thus, triggers an InsP3-dependent release of calcium from intracellular stores. A sustained aldosterone secretion induced by Ang II requires additional calcium entry from membrane calcium channels. The raised cytoplasmic calcium concentration in the ZG activates calcium/calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs), which increase expression and phosphorylation of transcription factors such as Nur-related factor 1 (Nurr1), nerve growth factor-induced clone B (NGFIB), Activating transcription factor 1 (ATF1), and CAMP responsive element binding protein 1 (CREB1). These transcription factors in turn activate promoter sites of *CYP11B2* and *StAR*

transcription and increase aldosterone. The higher demand for cholesterol requires its uptake from plasma lipoproteins. Ang II increases the expression of LDL and HDL receptors, which improves cholesterol availability for steroidogenesis. Ang II also activates the cellular hormone-sensitive lipase to release cholesterol stored in esterified form in lipid droplets (MacKenzie et al., 2019). Circulating potassium is also one of the major regulators of aldosterone secretion in ZG cells. Adrenal glomerulosa cells exhibit a high background potassium membrane conductance. Small increases in extracellular potassium depolarize the glomerulosa cells, increasing calcium influx through voltage-gated calcium channels that stimulates *CYP11B2* and *StAR* transcription (Hattangady et al., 2012). Therefore, multiple potassium and calcium channels regulate aldosterone secretion. ZG potassium channels as well as Na^+K^+ -ATPase control the repolarization of the cell membrane following calcium influx; any alteration of cell repolarization extends the time of calcium channels opening and therefore lengthens the duration of aldosterone secretion. Several mutations affecting ion channels and pumps have been reported to be associated with hormone overproduction in autonomous aldosterone-producing adenomas (Beuschlein et al., 2013; Choi et al., 2011; Fernandes-Rosa et al., 2018; Nakamura et al., 2015; Scholl et al., 2013, 2015, 2018; Zennaro et al., 2017, 2020).

ACTH only stimulates aldosterone secretion acutely and transiently, but to a lesser extent than Ang II and K^+ . ACTH binds to the transmembrane receptor melanocortin receptor 2 expressed both in ZG and ZF cells and exerts its downstream effects by activating adenylate cyclase, thus stimulating *StAR* expression (Betancourt-Calle et al., 2001). Aldosterone production is also regulated through a paracrine mechanism by bioactive compounds (leptin, serotonin, catecholamines, atrial natriuretic peptide, endothelin, nitric oxide, neuropeptide substance P) released by various cells such as adipocytes, mast cells, chromaffin cells or nerve ending located in the vicinity of adrenocortical ZG cells (Lefebvre et al., 2019; Wils et al., 2020). Finally, some studies have shown that numerous miRNAs regulate aldosterone production through posttranscriptional regulation of *CYP11B2* or *StAR* expressions (Robertson et al., 2017).

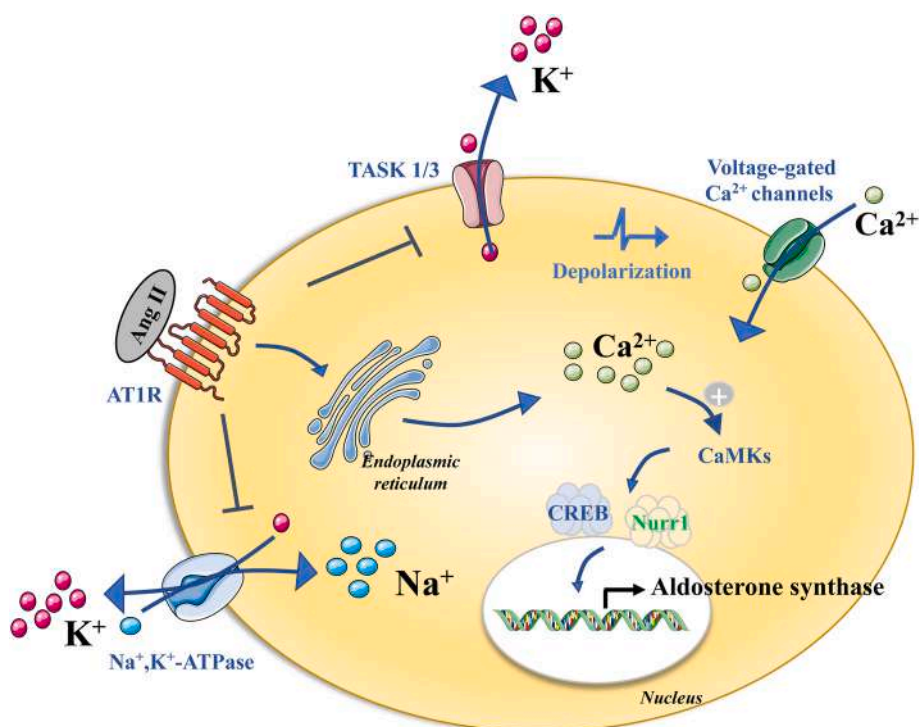


Fig. 1. Physiological regulation of aldosterone production in steroidogenic cells of the Zona Glomerulosa (ZG).

Binding of Ang II to AT1R leads the depolarization of the cell membrane that inhibits potassium channels and the Na^+,K^+ -ATPase and subsequently triggers an influx of extracellular Ca^{2+} and a release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum, that activates calcium/calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs). Then, CaMKs increase expression and phosphorylation of transcription factors such as Nurr1 and CREB1 thus stimulating expression of the *CYP11B2* gene, which encodes the aldosterone synthase, the enzyme that catalyzes the last steps of aldosterone biosynthesis.

Ang II: Angiotensin II; AT1R: Angiotensin 1 Receptor; TASK 1/3: potassium channels.

3.2. The mineralocorticoid receptor

3.2.1. Gene structure and functional domains

The genomic effects of aldosterone are mediated by the Mineralocorticoid Receptor (MR), a nuclear receptor acting as a transcription factor capable of modulating expression of target genes responsible for physiological effects of aldosterone (Viengchareun et al., 2007). The *NR3C2* gene, encoding the human MR, extends over nearly 450 kb and is located at locus 4q31.1-4q31.2 (Fan et al., 1989; Morrison et al., 1990). The *hMR* gene presents with 10 exons and 8 introns: the first two exons, 1 α and 1 β , are not translated and are spliced alternatively onto the common exon 2, generating two messenger isoforms (hMR α and hMR β), which encode the same 984 amino-acids protein (~107 kDa) (Zennaro et al., 1995). MR protein is organized into four distinct structural domains, including the N-terminal domain (NTD), the DNA binding domain (DBD), the hinge region and the ligand binding domain (LBD).

3.2.2. MR expression in epithelial and non-epithelial tissues

MR expression was first described in epithelial tissues, in which MR and aldosterone stimulate sodium reabsorption and excretion of potassium (Bonvalet, 1998; Marver et al., 1974). Its expression was demonstrated in the kidney, first in the distal convoluted tubules and cortical collecting ducts (Krozowski et al., 1989; Lombès et al., 1990) and later, in the mesangial cells (Miyata et al., 2005; Nishiyama et al., 2005) and podocytes of the glomeruli (Shibata et al., 2007). In parallel, MR expression was detected in the distal colon of rat (Pressley and Funder, 1975), human (Lombes et al., 1984) and chick (Rafestin-Oblin et al., 1989), and in airway epithelia from bronchiole to trachea (Krozowski and Funder, 1981), in the salivary (Funder et al., 1972) and sweat glands (Kenouch et al., 1994), in the liver (Duval and Funder, 1974) and in the inner ear (Furuta et al., 1994; Nevoux et al., 2015; Pitovski et al., 1993; Teixeira et al., 2006). Subsequently, MR expression was intriguingly detected in non-epithelial tissues. Indeed, specific aldosterone-binding sites were revealed in mononuclear leukocytes (Armanini et al., 1985) and macrophages (Lim et al., 2007). Thereafter, MR expression was detected in the hippocampus, which is a brain structure involved in many cognitive processes (Herman et al., 1989; Van Eekelen et al., 1988) suggesting that aldosterone and MR may be involved in memory processes (Pavlidis and McEwen, 1999). In 1992, the discovery of MR expression in the heart and in the large vessels further broadened the field of investigation into the mechanism of action of aldosterone and its receptor and allowed research to be directed towards previously unsuspected pharmacological and therapeutic perspectives, particularly in the field of cardiology. Immunohistochemistry showed that MR was clearly expressed in myocytes and in endothelial cells of the atria and ventricles in rabbits. In large vessels, MR was found in the aorta and pulmonary artery, particularly in endothelial cells and vascular smooth muscle cells (Lombès et al., 1992). Interestingly, MR expression was also demonstrated in skin, a stratified epithelium in which no ion transport had been clearly established even though amphibian skin had long been known as the site of ion transport (Kenouch et al., 1994; Sainte Marie et al., 2007). More intriguingly, MR expression was detected in adipose tissues, in which MR was shown to play a pivotal role in white adipocyte differentiation (Caprio et al., 2007; Rondinone et al., 1993). In addition, our group identified the brown adipose tissue as a novel target for aldosterone action (Zennaro et al., 1998) and demonstrated that aldosterone is capable of inducing differentiation of brown adipocytes (Penfornis et al., 2000) and exerts a control on energy balance. This list of MR expression in tissues is far from being exhaustive. Indeed, MR is also expressed in several structures of the eyeball such as the retina, the pigmented epithelium, the ciliary bodies of the iris and the cornea (Mirshahi et al., 1997; Schwartz and Wysocki, 1997). MR is also expressed in placenta (Hirasawa et al., 2000), uterus, ovaries and testes, spleen and smooth muscle (Le Menuet et al., 2000a). Thus, this broad tissue expression of MR strongly suggests that MR exerts functions other than those previously described in polarized epithelial tissues.

3.2.3. Mechanism of MR action in a renal polarized epithelial cell

In a typical polarized epithelial principal cell of the distal nephron, aldosterone enters cells by passive diffusion and binds to the MR (Fig. 2). This latter is exclusively located in the cytoplasm in the absence of its ligand and is complexed with various chaperon proteins (hsp70, hsp90, Cyp40, FKBP52). Then, the binding of aldosterone to MR induces dissociation of these chaperon proteins and conformational changes of the receptor. After translocation to the nuclear compartment, the hormone-receptor complex binds mostly as homodimers to specific DNA sequences, identified as Mineralocorticoid Response Elements (MREs), which are in the regulatory regions of aldosterone-sensitive genes. The consensus sequence of these MREs corresponds to a 15-nucleotide-sequence AGaACAgxaTGTtCt consisting of partial palindromic motif as identified by Chromatin Immunoprecipitation assays followed by DNA sequencing (ChIP-Seq) (Le Billan et al., 2015). Thereafter, MR interacts, in a cyclic, sequential and/or combinatorial manner (Le Billan et al., 2018), with several transcriptional coregulators and some basal transcription factors or components of the machinery to enhance transcriptional activation (initiation and elongation) and to facilitate chromatin remodeling involving histone acetylation/methylation (Le Billan et al., 2015). In epithelial tissues (kidney and colon), MR stimulates expression of ionic transporters: the Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) and the basolateral Na⁺,K⁺-ATPase pump, which are involved in the unidirectional transepithelial sodium transport from the lumen to the *interstitium*. The Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (sgk1) is the most studied aldosterone-stimulated gene in epithelial tissues, which phosphorylates the ubiquitin ligase Nedd4-2, which in turn controls the retrieval of the subunits of ENaC from the apical membrane of the cell. Several other target genes have been identified such as the Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper protein (GILZ), the serine/threonine kinase KS-WNK1 (With No lysine K kinase), the N-myc Down-Regulated Gene 2 (NDRG2), or the small monomeric GTP-binding protein Kirsten Ras (Ki-Ras), which also seem to play pivotal roles during the early phase of aldosterone responses in the nephron (Viengchareun et al., 2007; Laulhé et al., 2021). The *PER1* gene has recently been identified as another aldosterone-target gene in the kidney (Gumz et al., 2009), suggesting that aldosterone may also regulate the rhythmicity of renal sodium reabsorption since *PER1* belongs to the circadian clock gene family. Beyond this classical model of aldosterone action, recent data obtained from ChIP experiments revealed that MR can also indirectly bind to recognition motifs for other transcription factors (FOX, EGR1, AP1, PAX5), suggesting functional interactions of MR with other transcription factors through tethering mechanisms, thus enabling the modulation of target gene expression (Le Billan et al., 2015).

3.2.4. Regulation of MR expression

The *NR3C2* gene expression is controlled by two alternative promoters (Zennaro et al., 1996). The proximal P1 promoter, corresponding to the 5'-flanking region of exon 1 α of *NR3C2* gene, is a relatively strong promoter that is transcriptionally active in all aldosterone target tissues, whereas the distal P2 promoter, flanking exon 1 β of *NR3C2* gene, is weaker and has a more restricted pattern of expression, notably in the central nervous system (Le Menuet et al., 2000b). Alternative transcription of these two 5'-untranslated exons (1 α and 1 β) generates two mRNA isoforms, referred to as hMR α and hMR β , which give rise to the same MR protein (Zennaro et al., 1995). Interestingly, several other MR splice variants, lacking one ($\Delta 6$ MR) or two exons ($\Delta 5,6$ MR), have been identified so far and such splice variants seem to play major roles in modulating receptor function (Lema et al., 2017a; Zennaro et al., 2001).

MR transcripts stability is also regulated at the posttranscriptional level. This is particularly relevant in the nephron where MR expression was recently shown to be modulated by large variations of extracellular tonicity, prevailing in the renal tubules (Viengchareun et al., 2009). Indeed, hypertonicity was shown to greatly decrease MR transcript levels by recruiting the RNA Binding Protein (RBP) Tis11 b

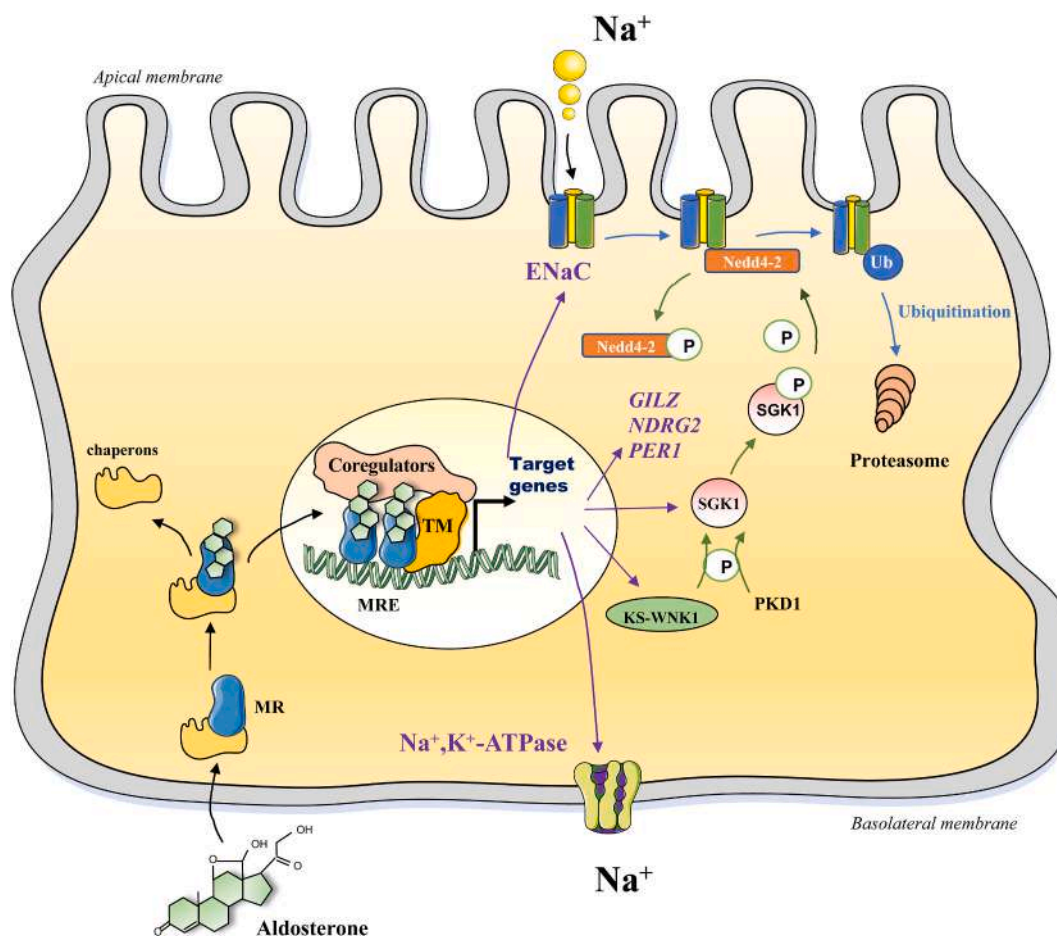


Fig. 2. Model of mineralocorticoid signaling in the distal polarized tubular cell of the kidney.

Aldosterone binds to its intracytoplasmic receptor. The aldosterone-MR complex is translocated to the nucleus where it binds DNA in the form of homo- or heterodimers and initiates the transcription of specific target genes. In the kidney, most of these target genes are involved in the regulation of sodium reabsorption from primary urine (apical compartment) to the interstitium (basolateral compartment). MR: Mineralocorticoid Receptor, MRE: Mineralocorticoid Receptor Element. Target genes of the mineralocorticoid pathway: Na^+, K^+ -ATPase: Na^+, K^+ -ATPase pump, Gilz: Glucocorticoid-induced leucine zipper, ENaC: Epithelial Na^+ Channel, Sgk1: Serum and Glucocorticoid-Regulated kinase 1, Nedd4-2: Ubiquitin Ligase of the Nedd4 family, KS-WNK1: With No lysine K kinase, NDRG2: N-myc Down-Regulated Gene 2, PER 1: clock gene period 1. TM: Transcriptional Machinery.

(tetradecanoyl phorbol acetate inducible sequence 11 b), which physically interacts with MR transcript 3'-untranslated region (3'-UTR), thus modulating its mRNA turnover in response to osmotic stress (Viengchareun et al., 2014). Conversely, MR transcript and protein levels were shown to increase under hypotonicity by recruiting HuR (Human antigen R), another RBP member of the Hu family. Under hypotonic stress, HuR is rapidly exported from the nuclear compartment to the cytoplasm of renal cells, where it interacts with MR 3'-UTR to stabilize and increase MR levels, thereby modulating MR signaling (Lema et al., 2017b). During this past decade, microRNAs (miRNAs) have also emerged as a new class of posttranscriptional regulators (Bartel, 2004; Ozbaki-Yagan et al., 2020). Taken together, RNA Binding Protein and miRNAs seem to be of particular importance in the control of MR expression, presumably during the prenatal period and notably at birth, where renal MR expression is downregulated, accounting for the transient physiological renal resistance to aldosterone observed in the early neonatal period (Martinierie et al., 2009b).

3.2.5. Mineralocorticoid selectivity mechanism

In the absence of a mineralocorticoid selectivity mechanism, MR would be permanently occupied by glucocorticoid hormones since plasma concentration of these hormones is 100–1000 times higher than that of aldosterone in mammals, depending on the nycthemeral cycle of glucocorticoid hormones. This illicit occupation of the MR by

glucocorticoid hormones is explained by the homology existing between the biochemical structure of aldosterone and cortisol and the high homology between the MR and the GR (Glucocorticoid Receptor). Indeed, the DBD and LBD of MR have, respectively, 94% and 57% identity with those of GR (Arriza et al., 1987). Moreover, these two receptors bind to the same GRE sequences and *in vitro* experiments have shown that affinity of MR is identical for aldosterone and glucocorticoid hormones (Arriza et al., 1987; Funder et al., 1988). The main mechanism responsible for mineralocorticoid selectivity relies on the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (11 β HSD2), an enzyme belonging to the superfamily of short-chain alcohol dehydrogenases (Edwards et al., 1988; Funder et al., 1988; Jörnvall et al., 1995). This enzyme has a high affinity for glucocorticoid hormones and oxidizes the alcohol function carried by carbon 11 of the glucocorticoid hormones into a ketone function, thus producing 11 β -dehydrogenated derivatives (cortisone for cortisol in humans and 11-dehydrocorticosterone for corticosterone in rodents) that have little or no affinity for MR, or even for GR (Funder et al., 1988). In cells co-expressing MR and 11 β HSD2, the illicit occupation of the MR by glucocorticoid hormones is thus clearly limited by the action of this enzyme, allowing aldosterone to act selectively onto its receptor in order to specifically exert its biological effects on sodium reabsorption. Of note, mineralocorticoid selectivity is also ensured by an intrinsic property of the receptor since MR can discriminate between aldosterone and glucocorticoids because dissociation rates (k_{-1}) are

much faster for glucocorticoids than for aldosterone. Moreover, it has been shown that the aldosterone–MR complex adopts structural conformation somehow different from that of the glucocorticoid–MR complex, thereby allowing distinct interaction between the N-terminal domain and the LBD to occur. Thus, specific coactivators may be recruited resulting in a highly specific transcriptional response (Farman and Rafestin-Oblin, 2001). Recently, it has also been demonstrated that specific cyclical and dynamic interaction of MR with DNA, as a function of the nature of the MR-bound ligand, is responsible for distinct transcriptional signatures (Le Billan et al., 2018).

4. Ontogenesis of the adrenal gland and mineralocorticoid signaling pathway throughout evolution

4.1. Ontogenesis of corticosteroid receptors during evolution

The corticosteroid signaling system in fish clearly differs from that of mammals (Kiilerich et al., 2015). In fish, cortisol is the major corticosteroid while aldosterone seems to be lacking (Jiang et al., 1998; Prunet et al., 2006). Consequently, cortisol not only regulates energy metabolism but also hydromineral homeostasis notably during seawater and freshwater adaptation and *via* chloride cell function. Whether cortisol acts through the GR or MR remained a subject of debate for a long period of time. In the zebrafish, some authors demonstrated that cortisol could also activate the GR and functions as a mineralocorticoid by affecting epidermal ionocyte development and ion transport (Cruz et al., 2013; Kumai et al., 2012). Moreover, deoxycorticosterone (DOC), seems to be able to specifically bind and activate MR (Sturm et al., 2005).

Two GR isoforms (GR1 and GR2), probably raising from the 350 Million years ago whole genome duplication, have been described in many fishes while the MR seems to derive from the ancestral Corticosteroid Receptor (CR), expressed in the lamprey and hagfish (Baker,

2019), however its role remains to be further clarified. Ontogenesis of MR and GR during evolution revealed that both receptor expressions appeared in the Chondrichthyes, including sharks and that they are also expressed in the teleost fish such as Holostei and Sturgeons. Aldosterone was first detected in the lungfish and remains detected in the subsequent vertebrates: frogs, salamanders, turtles, lizards, snakes, crocodiles, birds, and mammals (Fig. 3).

Recently, progesterone was shown to be an MR agonist in a range of teleost fish (Pippal et al., 2011; Baker and Katsu, 2017; Katsu et al., 2018; Fuller et al., 2021). This rather unexpected result could be explained by the demonstration that leucine substitution by serine or threonine at position 810 in helix-5 of the MR LBD enables contact with an alanine at position 773 in helix-3, suggesting that helix-3/helix-5 interaction is critical for ligand-dependent MR activation (Geller et al., 2000; Zhang et al., 2005; Fuller et al., 2019).

4.2. Ontogenesis of adrenal glands in amphibians

Like in mammals, the adrenal gland in amphibian is constituted of two tissues, different in function and in embryonic origin: the chromaffin tissue that produces the catecholamines and the steroidogenic tissue that produces glucocorticoid, mineralocorticoid, and androgenic hormones (Norris and Carr, 2013). In amphibians, the primary glucocorticoid is corticosterone. While the adrenals in mammals have a characteristic cortical-medullary organization with distinct zonation, such distinctions are lacking in non-mammalian species. In Anurans, adrenocortical tissue corresponds to irregular nodules organized into a pair of inter-renal glands on the ventral surface of the kidneys. The glandular pattern is, on one hand, more medial and diffuse in frogs of the more primitive families and, on the other hand, more lateral and aggregated in the more advanced families (Milano and Accordi, 1986). In Urodeles, the adrenal glandular structure is variable without a clear

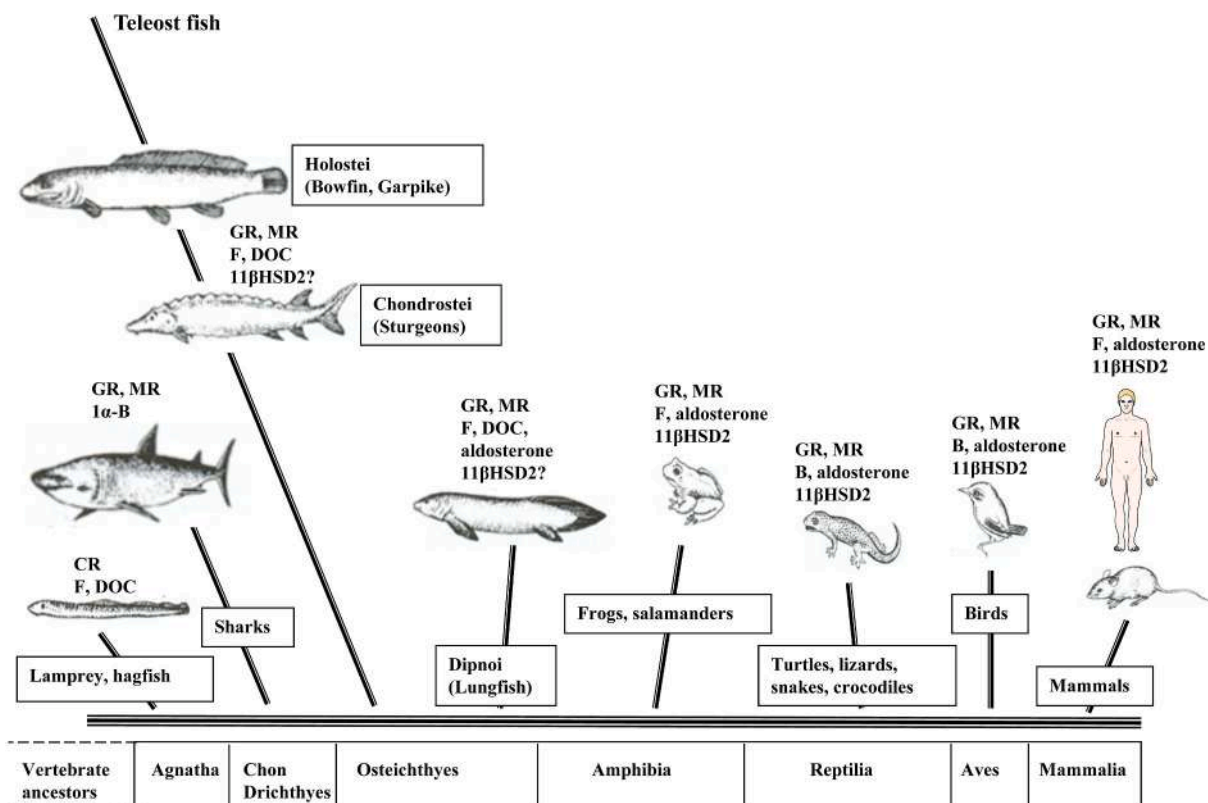


Fig. 3. Expression of corticosteroid receptors and their ligands throughout evolution.

CR: ancestral corticosteroid receptor, GR: Glucocorticoid Receptor, MR: Mineralocorticoid Receptor, F: Cortisol, DOC: Deoxycorticosterone, 1α-B: 1 alpha-corticosterone, 11βHSD2: 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (adapted from and courtesy of P. Prunet, INRA Rennes, France).

taxonomic pattern, although increased compactness of the gland and mingling of steroidogenic and chromaffin cells can be found. The compactness and aggregation of chromaffin and steroidogenic tissues therefore increase in the transition from primitive to advanced families, both in urodeles and anurans. Ontogenesis of the gland is similar in all amphibians studied. The chromaffin originates from neural crest cells by migration and the primordium of the steroidogenic tissue coincides with or is near to the mesonephric blastema. In Anuran, the gland develops on the kidney of mesonephric type by a moderate cell proliferation of the dorsal root of the dorsal mesentery leading to the interrenal tissue, homologous with the mammal's adrenal cortex. The persistence of the mesonephros will preserve the contact established between the two organs during ontogenesis. Until the end of metamorphosis (biological process by which larva physically transforms after birth into an adult, involving a conspicuous and relatively abrupt change in the animal's body structure, allowing evolution from aquatic to a terrestrial or semi-terrestrial lifestyle), morphogenesis of the adrenal gland is similar in all amphibians studied. After metamorphosis in the advanced anurans, the adrenal gland may reach its definitive position before sexual maturity by various means, among which active cellular movements prevail. The inter-renal gland is generally more active just before metamorphosis and metamorphic climax. The corticosteroids (CS) plasma levels are low-to-nondetectable before metamorphosis, but increase significantly at metamorphic climax, in parallel with the rise in thyroid hormones (TH), the metamorphosis trigger (Jaudet and Hatey, 1984). Surprisingly, whole-body CS content increases before metamorphosis and then declines to be low at metamorphic climax or in some cases shows a small increase at metamorphic climax (Glennemeier and Denver, 2002; Kloas et al., 1997). Whether these findings represent species differences or whether changes in whole-body CS content are not representative of changes in plasma concentrations is currently unknown. Aldosterone plasma levels first show a significant peak at the beginning of the climax and again at the middle of the climax. Whole-body aldosterone peak production is detected before metamorphosis and declines thereafter as observed for corticosteroids (Glennemeier and Denver, 2002; Kloas et al., 1997).

The neuroendocrine system regulates the production of hormones by the adrenal and thyroid glands (Denver, 2009a). Hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) is a common, central regulator of pituitary adrenocorticotropic hormone (ACTH) secretion and thyroid-stimulating hormone (TSH) in tadpoles. By regulating TSH and ACTH secretion, and consequently the production of TH and CS, CRF controls the timing of metamorphosis integrating developmental progression and environmental signals. Thus, TH is considered as the primary morphogen of metamorphosis, while CS synergize with TH to promote metamorphic changes (Denver, 2009b). Aldosterone could play a part in the differentiation of adult skin and a role in the conquest of land (Colombo et al., 2006). However, the history of CS seems more linked to the struggle for survival and environmental resources (Denver, 2009b). Interestingly, mast cells, implicated in the regulation of aldosterone secretion, primarily appear in amphibian and their density follows a seasonal variation, with a rise in summer, linked to metamorphosis and amphibians' way out of water (Lopez et al., 2020).

4.3. Ontogenesis of the adrenal gland and the mineralocorticoid pathway in mammals

4.3.1. Zona glomerulosa and CYP11B2 expression

The adrenal cortex originates from the intermediate mesoderm while the medulla develops from the neuroectoderm and colonizes the adrenal cortex around 6–7 GW. In humans, the coelomic epithelium proliferates starting from 4 GW to form the urogenital crest, which will give rise to the adrenal glands as well as the gonads and the kidneys. Then, the adreno-gonadal primordium individualizes from the renal outline, and splits into the gonadal and adrenal primordium. Around 8 GW in humans, two different histological layers appear within the adrenal

primordium, composed of the external definitive zone (DZ), and the internal fetal zone (FZ), which represents 80% of the volume of the adrenal cortex at this stage. During the second trimester of gestation, a transition zone (TZ) individualizes between the definitive and fetal zones (Mesiano and Jaffe, 1997a). The fetal adrenal gland is dynamic with simultaneous proliferation of progenitor cells within the subcapsular layer, centripetal migration and cell apoptosis (Drelon et al., 2015), the latter being mainly localized in the internal compartment (Ishimoto and Jaffe, 2011). Many factors are involved in the human adrenal gland development i.e. hormonal factors, transcription factors and growth factors. ACTH is one of the main hormonal factor involved in this process, secreted as early as 8 GW by the fetal pituitary (Ishimoto et al., 2006); however, it has been demonstrated that pituitary Luteinizing Hormone (LH) and placental human Chorionic Gonadotropin (hCG) also contribute to adrenal development (Kero et al., 2000). SF1 (Steroidogenic Factor 1) and DAX1 (DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1) are two essential transcription factors involved in adrenal cortex development, both being expressed from 33 days post-conception within the adrenogonadal primordium (Suntharalingham et al., 2015). SF1 acts as a regulator of many genes involved in steroidogenesis including the ACTH receptor gene, *StAR*, *CYP17*, *HSD3B1*, *CYP21*, and *CYP11B1*. In addition, DAX1 and SF1 demonstrate complex functional interactions. Indeed, DAX1 is a transcription repressor of SF1 target genes, such as *StAR*, and is able to inhibit transcriptional activation mediated by SF1 (Lalli and Alonso, 2010). The adrenal gland development is also regulated by many growth factors such as bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), IGF-I (Insulin-like Growth Factor I), IGF-II (Insulin-like Growth Factor II), and the TGF β (Transforming Growth Factor β) family. For example, IGF-II is thought to stimulate the proliferation of steroidogenic cells and is involved in the activation of steroidogenesis mediated by ACTH (Mesiano and Jaffe, 1997b). The three areas of the fetal cortex (ZD, ZT and ZF) are morphologically and functionally different, depending on the selective expression of genes involved in steroidogenesis, thus allowing specificity for hormone biosynthesis (Narasaka et al., 2001). The definitive zone expresses both the 3β HSD2 and CYP11B2 enzymes allowing for aldosterone biosynthesis. Recent studies showed that 3β HSD2 is expressed starting from 18 GW in both definitive and fetal zones whereas expression of CYP11B2 only appears around 24 GW and is restricted to the subcapsular layer of the adrenal gland (Coulter and Jaffe, 1998; Naccache et al., 2016). This relatively late expression may explain the absence of detection of plasma aldosterone in fetuses from 9 to 20 GW (Johnston et al., 2018). Recent studies have also demonstrated a delayed CYP11B1 activity both in the ZD and ZT (Kamrath et al., 2014; Travers et al., 2018). Aldosterone production begins during fetal life with detectable plasma concentrations in premature newborns as early as 25 GW (Bourchier, 2005; Martinerie et al., 2015). Plasma aldosterone concentration increases until term (Martinerie et al., 2015), in relation to a fetal neo-synthesis (Bayard et al., 1970).

In mice, organogenesis of the adrenal gland follows the same developmental stages during gestation (which lasts approximately 21 days long). It begins on the 9th day of gestation (E9). Zoning begins around E12, and the different areas of the cortex are identifiable at E16. Plasma aldosterone concentrations are detected in the fetus as early as E16 (Wotus et al., 1998). Thus, the establishment of aldosterone biosynthesis from the fetal stage appears as well-preserved among mammals. At birth, the adrenal gland in a full-term newborn is capable of secreting large amounts of aldosterone, with circulating concentrations usually 10-fold higher than in an adult. Plasma aldosterone concentration will then decrease gradually during the first year of life in humans to reach concentrations close to that of the adult, around the age of 1 year (Martinerie et al., 2015).

4.3.2. MR, 11β HSD2 and target genes

MR expression during renal development shows a particular profile

with a biphasic expression. It is followed in parallel by all the other players of the mineralocorticoid signaling pathway, expressed in the distal parts of the nephron (11 β HSD2 enzyme and target genes). This biphasic renal expression profile is extremely well-preserved between mice and humans (Fig. 4). Renal expression of MR, 11 β HSD2, and MR target genes is transient during gestation (between 15 and 30–34 GW in humans; and E16 and E18 in mice), then subsequently decreases as the term of birth approaches, before increasing again during the postnatal period, after the first week of life in mice. Renal expression of MR then increases very gradually during the first year of life in humans, along with the decrease in plasma aldosterone concentrations (Martinerie et al., 2009b). Thus, the mineralocorticoid signaling pathway is repressed in the kidney at birth, both in mice and humans. In contrast, this expression pattern is not identical in other organs where the mineralocorticoid signaling pathway is also expressed, such as the lung (Martinerie et al., 2013). Indeed, while in the heart and brain, expression of the MR and of the mineralocorticoid signaling pathway undergoes the same variation during development, the decrease of MR expression is not observed in the lung at the time of birth, where it is, on the contrary, maintained (Fig. 4). The expression of this signaling pathway is therefore tissue-specific and variable during development, particularly in the renal tubule, identically between mice and humans, suggesting an important physiological role in the preparation and/or the adaptation to extrauterine life.

5. Physiological role during the perinatal period?

It seems relevant to question the role of this tissue-specific and temporal expression pattern of the mineralocorticoid pathway during development. The first element to consider concerns the fetal period. Interestingly, both in mice and in humans, the appearance of MR at E16 and around 15–20 GW, respectively, corresponds to the initiation phase of skin keratinization (Underwood et al., 2005). It is, thus, highly possible that from this stage of development and onward the exchanges between fetal internal environment and the amniotic fluid are no longer passive, and that a mode of regulation at the renal level becomes necessary and pivotal. Subsequently, changes in renal MR expression could be related to variations of tonicity (and sodium content) of the surrounding environment (Underwood et al., 2005), somehow reminiscent of what is observed in fish. As mentioned in chapter 4.1, fishes,

in particular salmons, express MR in their gills. When they acclimate from a freshwater environment to a saltwater environment during their life, MR expression adapts, being repressed, and inversely, upregulated when salmons return to freshwater, thus making it possible to maintain the water and sodium balance in the interior environment (Külicher et al., 2015). Similarly, the osmolality of the amniotic fluid is stable in mice up to E16.5, where it decreases sharply (in parallel with the increase in MR renal expression), preceding a sharp increase before birth (Cheung and Brace, 2005; Desai et al., 2003) which coincides with the decrease in renal MR expression (Martinerie et al., 2009b). In addition, in humans, after birth, the newborn kidney must adapt from an aquatic environment to an air environment. The newborn must adjust to a very low sodium intake from breast milk, which further decreases during the first days of life (Koo and Gupta, 1982) (again reflecting the gradual increase in renal MR expression after the first week of life). At birth, the newborn kidney lacks MR expression, thus making it unresponsive to aldosterone. As we have seen above, aldosterone is secreted in large quantities by the adrenal gland in late pregnancy and at birth. This relative renal resistance to its action leads to a state of transient pseudo-hypoaldosteronism, associating hyponatremia (by sodium depletion), hyperkalemia, urinary sodium and water losses, accounting for neonatal weight loss observed physiologically during the first days of life (Martinerie et al., 2009a). Conversely, expression of MR is maintained in the lung at birth. The lung can therefore respond to high concentrations of aldosterone, and thus allow the resorption of pulmonary fluid, through expression of ENaC, the alpha subunit being a target gene of the aldosterone-MR complex (Helve et al., 2004). Kidneys are then able to eliminate this excessive fluid. Finally, aldosterone could also have a direct role on the blood vessels and allow an increase in systemic vascular resistance at birth (Romagnoli et al., 2003). Aldosterone therefore appears to be a central hormone in the adaptation to extrauterine life. Interestingly, regarding evolution, aldosterone is first detected in the lungfish, primary living being able to breathe, and in amphibians, whose ancestors came out of water during the terrestrialization, emphasizing this hypothesis (Fig. 3).

6. Animal models and pathophysiological situations demonstrating this central role in neonatal adaptation

6.1. Defects in the activation of the mineralocorticoid signaling pathway

The physiological importance of the mineralocorticoid signaling pathway is largely underscored by human pathologies as well as comforted by the phenotypes of recently generated knock-out animal models (both in mammals and in fish). The total as well as cell-specific gene inactivation have further deciphered the functional aspect and the molecular events involved in the mineralocorticoid signaling. Approximately one hundred MR loss-of function mutations presenting with a pseudohypoaldosteronism have been reported in humans (Zennaro and Fernandes-Rosa, 2017) as opposed to the unique MR gain-of-function mutation described in a family in which affected carriers presented with early arterial hypertension exacerbated during pregnancy (Geller et al., 1998). The major role of MR in sodium and water homeostasis has been further corroborated by the phenotype of animal models. For instance, total MR knock-out mouse model has been generated almost three decades ago (Berger et al., 1998) and demonstrated that despite a normal *in utero* development, newborn mice prematurely die at 10 days of life from severe salt and water wasting that could be partially successfully treated with salt supplementation through intra-peritoneal injections (Bleich et al., 1999). In addition, a siRNA strategy against MR in the rat (Lim et al., 2008) further demonstrated the importance of renal MR expression for an appropriate water and sodium homeostasis. Cell-specific and sometimes inducible MR gene inactivation including principal renal cells (Ronzaud et al., 2011), cardiomyocytes (Ouvrard-Pascaud et al., 2005), endothelial cell (Laursen et al., 2018), macrophage (Rickard et al., 2009), adipocyte (Caprio et al., 2007),

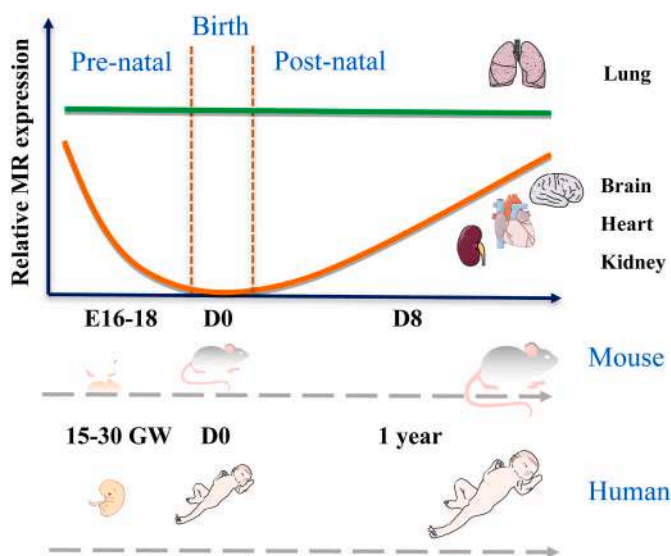


Fig. 4. Mineralocorticoid receptor expression profile during development in mice and humans.

MR: Mineralocorticoid receptor. D0: Day of birth.

GW: week of gestation. E16-18: 16th to 18th day of gestation.

neuronal (van Weert et al., 2019) have also elucidated key molecular events regulated by MR. Constitutive corticosteroid knockout zebrafish and medaka which constitute viable animal models of corticosteroid receptor gene inactivation have been generated (Sakamoto et al., 2018) and besides the role of MR in osmoregulation notably in mammals, these models allowed to point out towards a well conserved function of corticosteroid receptor in vertebrates integrating brain-behavior and visual responses, consistent with the presence of MR in the mammal retina (Zhao et al., 2012). These studies in fish underscore that MR signaling is clearly not restricted to osmoregulation but may have a wider physiological impact that remains to be further elucidated (Rossier, 2016). Concerning ligand inactivation in humans, approximately forty-five inactivating mutations of the *CYP11B2* gene, encoding the cytochrome P450 enzyme aldosterone synthase responsible for aldosterone synthesis and production have been described to date (Miao et al., 2019). Aldosterone deficiency syndrome is a rare autosomal recessive disorder in infants characterized by hyponatremia, severe hyperkalemia, associated with salt wasting, dehydration and failure to thrive contrasting with low plasma aldosterone concentrations while 18-hydroxycorticosterone concentration might differentiate the level of enzymatic defect. The recent liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) method should now facilitate quantification and identification of appropriate steroid levels both in human plasma and urinary samples (Pussard et al., 2020; Travers et al., 2017). Genetic analyses, notably by next generation sequencing, demonstrated classical genetic alterations, the most common being missense and nonsense mutations, leading to an impaired enzymatic activity (Miao et al., 2019).

6.2. Transient pseudohypoaldosteronism

In addition to these genetic diseases, there are pathological situations where a transient, non-physiological pseudohypoaldosteronism appears (Bogdanović et al., 2009). These pseudohypoaldosteronisms result in hyponatremia, hyperkalemia, metabolic acidosis and severe dehydration with major urinary sodium loss. They are essentially linked to the occurrence of an infection of the upper urinary tract (pyelonephritis) with or without underlying uropathy; and have the particularity of occurring mainly in infants under 3 months of age, most notably in males (Bogdanović et al., 2009). They will disappear with the correction of the urinary tract infection, but during the acute phase, they will require active management by sodium and water supplementation. The pathophysiology may be related to low renal expression of the mineralocorticoid pathway during this period of life, and to inflammation (through the activation of NF-KB factor) that may further downregulate MR expression and activation (de Seigneux et al., 2008). The fact that boys seem more particularly affected, could be explained by a sexual dimorphism in the renal expression of the mineralocorticoid signaling pathway (Dumeige et al., 2017), making boys more sensitive to a decline in its expression.

6.3. Specificity of the premature infants

The mineralocorticoid signaling pathway seems essential in the postnatal period. Thus, it can be wondered if the premature infant, whose organ maturation is not yet completed, has the capacity to adapt at birth. Aldosterone secretion increases gradually during fetal life, starting from 25 GW (Bourchier, 2005; Martinerie et al., 2015). Very premature infants (birth before 32 GW), therefore have a limited capacity for aldosterone neo-synthesis (linked to an overall immaturity of the adrenal gland associated with a specific lack of biological activity of the 11- β -hydroxylase enzyme (Kamrath et al., 2014; Travers et al., 2018). The adrenal gland is not able to adapt to neonatal changes, and aldosterone concentrations remain 3 to 4 times lower than in a full-term newborn (around 300 pg/mL compared to 1000 pg/mL on average, by RIA measurement) (Martinerie et al., 2015). It should be noted, however, that these concentrations are 4 times higher than that of an adult

(on average 80 pg/mL) again underlining the importance of this hormone, which must be secreted in large quantities, for optimal postnatal adaptation. Thus, despite a transient MR expression at the renal level in very premature infants between approximately 25 and 30 GW, allowing the kidney to respond transiently to the action of aldosterone (Martinerie et al., 2009b, 2015), the relatively low secretion of aldosterone does not permit an active sodium reabsorption during the first weeks of life. Likewise, the lung has difficulty reabsorbing alveolar fluid (Helve et al., 2004).

7. Conclusions

The mineralocorticoid signaling pathway therefore appears to be a primary pathway for adaptation to extrauterine life. Regarding evolution, while MR is already expressed in fish, aldosterone expression appears in the amphibian, one of the first living being that evolves outside water. Similarly, aldosterone secretion increases throughout gestation in mammals, preparing the fetus for its extrauterine life, reaching levels in full-term newborns approximately 10-fold higher than that of the adults. Defects in aldosterone production or activation of the mineralocorticoid pathway result in neonatal maladaptation at birth. In premature newborns, due to the relative low levels of circulating aldosterone, a sodium wasting syndrome sets in, causing dehydration, hyponatremia and hyperkalemia, which can be life-threatening. Altogether, results obtained from comparative evolution and over the last ten years specifically in mammals, have shed light on a central role for mineralocorticoid signaling and have pointed out to new therapeutic opportunities for preventing urinary sodium loss in very premature infants.

Funding

This research was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (Inserm), the University Paris-Saclay, and the French National Agency for Research (ANR), grant no. ANR-20-CE14-0015 (PERIMIRE).

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research.

References

- Armanini, D., Strasser, T., Weber, P.C., 1985. Characterization of aldosterone binding sites in circulating human mononuclear leukocytes. *Am. J. Physiol.* 248, E388–E390. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1985.248.3.E388>.
- Arriza, J.L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T.M., Handelin, B.L., Housman, D.E., Evans, R.M., 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237, 268–275.
- Ayala, F.J., 1977. Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. *Theodosius Dobzhansky: 1900-1975 J Hered* 68 (1), 3–10. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a108767>. Jan-Feb.
- Baker, M.E., 2019. Steroid receptors and vertebrate evolution. *Mol. Cell. Endocrinol.* 496 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110526>, 110526.
- Baker, M.E., Katsu, Y., 2017. 30 years OF the mineralocorticoid receptor: evolution of the mineralocorticoid receptor: sequence, structure and function. *J. Endocrinol.* 234, T1–T16. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0661>.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bassett, M.H., White, P.C., Rainey, W.E., 2004. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 217, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.011>.
- Bayard, F., Ances, I.G., Tapper, A.J., Weldon, V.V., Kowarski, A., Migeon, C.J., 1970. Transplacental passage and fetal secretion of aldosterone. *J. Clin. Invest.* 49, 1389–1393. <https://doi.org/10.1172/JCI106356>.
- Berger, S., Bleich, M., Schmid, W., Cole, T.J., Peters, J., Watanabe, H., Kriz, W., Warth, R., Greger, R., Schütz, G., 1998. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9424–9429. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9424>.

- Betancourt-Calle, S., Calle, R.A., Isales, C.M., White, S., Rasmussen, H., Bollag, W.B., 2001. Differential effects of agonists of aldosterone secretion on steroidogenic acute regulatory phosphorylation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 173, 87–94. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00411-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00411-1).
- Beuschlein, F., Boulikroun, S., Osswald, A., Wieland, T., Nielsen, H.N., Lichtenauer, U.D., Penton, D., Schack, V.R., Amar, L., Fischer, E., Walther, A., Tauber, P., Schwarzmayr, T., Diener, S., Graf, E., Allolio, B., Samson-Couterie, B., Bencke, A., Quinkler, M., Fallo, F., Plouin, P.-F., Mantero, F., Meitinger, T., Mulatero, P., Jeunemaitre, X., Warth, R., Vilsen, B., Zennaro, M.-C., Strom, T.M., Reincke, M., 2013. Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nat. Genet.* 45, 440–444. <https://doi.org/10.1038/ng.2550>, 444e1–444e2.
- Bleich, M., Warth, R., Schmidt-Hieber, M., Schulz-Baldes, A., Hasselblatt, P., Fisch, D., Berger, S., Kunzelmann, K., Kriz, W., Schütz, G., Greger, R., 1999. Rescue of the mineralocorticoid receptor knock-out mouse. *Pflügers Archiv* 438, 245–254. <https://doi.org/10.1007/s004240050906>.
- Bockenbauer, D., Zieg, J., 2014. Electrolyte disorders. *Clin. Perinatol.* 41, 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2014.05.007>.
- Bogdanović, R., Stajić, N., Putnik, J., Paripović, A., 2009. Transient type 1 pseudo-hypoaldosteronism: report on an eight-patient series and literature review. *Pediatr. Nephrol.* 24, 2167–2175. <https://doi.org/10.1007/s00467-009-1285-8>.
- Bonvalet, J.P., 1998. Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney Int. Suppl.* 65, S49–S56.
- Bourchier, D., 2005. Plasma aldosterone levels in the 1st week of life in infants of less than 30 weeks gestation. *Eur. J. Pediatr.* 164, 141–145. <https://doi.org/10.1007/s00431-004-1572-0>.
- Caprio, M., Fève, B., Claës, A., Viengchareun, S., Lombès, M., Zennaro, M.-C., 2007. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *Faseb. J.* 21, 2185–2194. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7970com>.
- Cheung, C.Y., Brace, R.A., 2005. Amniotic fluid volume and composition in mouse pregnancy. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 12, 558–562. <https://doi.org/10.1016/j.jsjg.2005.08.008>.
- Choi, M., Scholl, U.I., Yue, P., Björklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C.J., Lolis, E., Wisgerhof, M.V., Geller, D.S., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Åkerström, G., Wang, W., Carling, T., Lifton, R.P., 2011. K+ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331, 768–772. <https://doi.org/10.1126/science.1198785>.
- Colombo, L., Valle, L.D., Fiore, C., Armanini, D., Belvedere, P., 2006. Aldosterone and the conquest of land. *J. Endocrinol. Invest.* 29, 373–379. <https://doi.org/10.1007/BF03344112>.
- Coulter, C.L., Jaffe, R.B., 1998. Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology* 139, 5144–5150. <https://doi.org/10.1210/endo.139.12.6333>.
- Cruz, S.A., Lin, C.-H., Chao, P.-L., Hwang, P.-P., 2013. Glucocorticoid receptor, but not mineralocorticoid receptor, mediates cortisol regulation of epidermal ionocyte development and ion transport in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One* 8, e77997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077997>.
- de Seigneux, S., Leroy, V., Ghzili, H., Rousselot, M., Nielsen, S., Rossier, B.C., Martin, P.-Y., Féraille, E., 2008. NF-kappaB inhibits sodium transport via down-regulation of SGK1 in renal collecting duct principal cells. *J. Biol. Chem.* 283, 25671–25681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803812200>.
- Denver, R.J., 2009a. Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1163, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04433.x>.
- Denver, R.J., 2009b. Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 164, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.016>.
- Desai, M., Ladella, S., Ross, M.G., 2003. Reversal of pregnancy-mediated plasma hypotonicity in the near-term rat. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 13, 197–202. <https://doi.org/10.1080/jmf.13.3.197.202>.
- Devuyt, O., 2008. Salt wasting and blood pressure. *Nat. Genet.* 40, 495–496. <https://doi.org/10.1038/ng0508-495>.
- Drelon, C., Berthon, A., Mathieu, M., Martinez, A., Val, P., 2015. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: a WNT perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.014>.
- Dumeige, L., Storey, C., Decourtye, L., Nehlich, M., Lhadji, C., Viengchareun, S., Kappeler, L., Lombès, M., Martinierie, L., 2017. Sex-specificity of mineralocorticoid target gene expression during renal development, and long-term consequences. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18020457>.
- Duval, D., Funder, J.W., 1974. The binding of tritiated aldosterone in the rat liver cytosol. *Endocrinology* 94, 575–579. <https://doi.org/10.1210/endo-94-2-575>.
- Edwards, C.R., Stewart, P.M., Burt, D., Brett, L., McIntyre, M.A., Sutanto, W.S., de Kloet, E.R., Monder, C., 1988. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 2, 986–989.
- Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Haley, L.L., Henry, W.M., Nowak, N.J., Shows, T.B., 1989. The human mineralocorticoid receptor gene (MLR) is located on chromosome 4 at q31.2. *Cytogenet. Cell Genet.* 52, 83–84.
- Farman, N., Rafestin-Oblin, M.E., 2001. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 280, F181–F192.
- Fernandes-Rosa, F.L., Daniil, G., Orozco, I.J., Göppner, C., El Zein, R., Jain, V., Boulikroun, S., Jeunemaitre, X., Amar, L., Lefebvre, H., Schwarzmayr, T., Strom, T.M., Jentsch, T.J., Zennaro, M.-C., 2018. A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. *Nat. Genet.* 50, 355–361. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0053-8>.
- Fuller, P.J., Yao, Y.-Z., Jin, R., He, S., Martín-Fernández, B., Young, M.J., Smith, B.J., 2019. Molecular evolution of the switch for progesterone and spironolactone from mineralocorticoid receptor agonist to antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 18578–18583. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903172116>.
- Fuller, P.J., Yao, Y.-Z., Yang, J., Young, M.J., 2021. Structural determinants of activation of the mineralocorticoid receptor: an evolutionary perspective. *J. Hum. Hypertens.* 35, 110–116. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-0360-2>.
- Funder, J.W., Feldman, D., Edelman, I.S., 1972. Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *J. Steroid Biochem.* 3, 209–218.
- Funder, J.W., Pearce, P.T., Smith, R., Smith, A.L., 1988. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242, 583–585.
- Furuta, H., Mori, N., Sato, C., Hoshikawa, H., Sakai, S., Iwakura, S., Doi, K., 1994. Mineralocorticoid type I receptor in the rat cochlea: mRNA identification by polymerase chain reaction (PCR) and in situ hybridization. *Hear. Res.* 78, 175–180. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)90023-x](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)90023-x).
- Geller, D.S., Farhi, A., Pinkerton, N., Fradley, M., Moritz, M., Spitzer, A., Meinke, G., Tsai, F.T., Sigler, P.B., Lifton, R.P., 2000. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289, 119–123.
- Geller, D.S., Rodriguez-Soriano, J., Vallo Boado, A., Schifter, S., Bayer, M., Chang, S.S., Lifton, R.P., 1998. Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nat. Genet.* 19, 279–281. <https://doi.org/10.1038/966>.
- Glennemeier, K.A., Denver, R.J., 2002. Small changes in whole-body corticosterone content affect larval *Rana pipiens* fitness components. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127, 16–25. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00015-1).
- Gumz, M.L., Stow, L.R., Lynch, I.J., Greenlee, M.M., Rudin, A., Cain, B.D., Weaver, D.R., Wingo, C.S., 2009. The circadian clock protein Period 1 regulates expression of the renal epithelial sodium channel in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 2423–2434. <https://doi.org/10.1172/JCI36908>.
- Gunn, T.R., Mora, J.D., Pease, P., 1988. Outcome after antenatal diagnosis of upper urinary tract dilatation by ultrasonography. *Arch. Dis. Child.* 63, 1240–1243. <https://doi.org/10.1136/adc.63.10.1240>.
- Hasler, U., Mordasini, D., Bianchi, M., Vandewalle, A., Féraille, E., Martin, P.-Y., 2003. Dual influence of aldosterone on AQP2 expression in cultured renal collecting duct principal cells. *J. Biol. Chem.* 278, 21639–21648. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212388200>.
- Hattangady, N.G., Olala, L.O., Bollag, W.B., Rainey, W.E., 2012. Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol. Cell. Endocrinol.* 350, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.034>.
- Helve, O., Pitkänen, O.M., Andersson, S., O’Brodivich, H., Kirjavainen, T., Otulakowski, G., 2004. Low expression of human epithelial sodium channel in airway epithelium of preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics* 113, 1267–1272. <https://doi.org/10.1542/peds.113.5.1267>.
- Herman, J.P., Patel, P.D., Akil, H., Watson, S.J., 1989. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol. Endocrinol.* 3, 1886–1894. <https://doi.org/10.1210/mend-3-11-1886>.
- Hirasawa, G., Takeyama, J., Sasano, H., Fukushima, K., Suzuki, T., Muramatu, Y., Darnel, A.D., Kaneko, C., Hiwataishi, N., Toyota, T., Nagura, H., Krozowski, Z.S., 2000. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1306–1309. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6429>.
- Ishimoto, H., Ginzinger, D.G., Jaffe, R.B., 2006. Adrenocorticotropin preferentially up-regulates angiotensin II in the human fetal adrenal gland: implications for coordinated adrenal organ growth and angiogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1909–1915. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2252>.
- Ishimoto, H., Jaffe, R.B., 2011. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the foeto-placental unit. *Endocr. Rev.* 32, 317–355. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0001>.
- Jaudet, G.J., Hately, J.L., 1984. Variations in aldosterone and corticosterone plasma levels during metamorphosis in *Xenopus laevis* tadpoles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 59–65. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(84\)90061-3](https://doi.org/10.1016/0016-6480(84)90061-3).
- Jiang, J.Q., Young, G., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 1998. Eel (*Anguilla japonica*) testis 11beta-hydroxylase gene is expressed in interrenal tissue and its product lacks aldosterone synthesizing activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 146, 207–211. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00147-6](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00147-6).
- Johnston, Z.C., Bellingham, M., Filis, P., Soffientini, U., Hough, D., Bhattacharya, S., Simard, M., Hammond, G.L., King, P., O’Shaughnessy, P.J., Fowler, P.A., 2018. The human fetal adrenal produces cortisol but no detectable aldosterone throughout the second trimester. *BMC Med.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1009-7>, 23.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D., 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34, 6003–6013. <https://doi.org/10.1021/bi00018a001>.
- Kamrath, C., Hartmann, M.F., Boettcher, C., Wudy, S.A., 2014. Reduced activity of 11β-hydroxylase accounts for elevated 17α-hydroxyprogesterone in preterms. *J. Pediatr.* 165, 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.04.011>.
- Katsu, Y., Oka, K., Baker, M.E., 2018. Evolution of human, chicken, alligator, frog, and zebrafish mineralocorticoid receptors: allosteric influence on steroid specificity. *Sci. Signal.* 11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao1520>, eao1520.
- Kenouch, S., Lombes, M., Delahaye, F., Eugene, E., Bonvalet, J.P., Farman, N., 1994. Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1334–1341. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.5.7962326>.

- Kero, J., Poutanen, M., Zhang, F.P., Rahman, N., McNicol, A.M., Nilson, J.H., Keri, R.A., Huhtaniemi, I.T., 2000. Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J. Clin. Invest.* 105, 633–641. <https://doi.org/10.1172/JCI7716>.
- Kiellerich, P., Triqueneaux, G., Christensen, N.M., Trayer, V., Terrien, X., Lombès, M., Prunet, P., 2015. Interaction between the trout mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in vitro. *J. Mol. Endocrinol.* 55, 55–68. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0002>.
- Kloas, W., Reinecke, M., Hanke, W., 1997. Stage-dependent changes in adrenal steroids and catecholamines during development in *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 416–426. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6998>.
- Koo, W.W., Gupta, J.M., 1982. Breast milk sodium. *Arch. Dis. Child.* 57, 500–502. <https://doi.org/10.1136/adc.57.7.500>.
- Krozowski, Z., Funder, J.W., 1981. Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology* 109, 1811–1813. <https://doi.org/10.1210/endo-109-6-1811>.
- Krozowski, Z.S., Rundie, S.E., Wallace, C., Castell, M.J., Shen, J.H., Dowling, J., Funder, J.W., Smith, A.L., 1989. Immunolocalization of renal mineralocorticoid receptors with an antiserum against a peptide deduced from the complementary deoxyribonucleic acid sequence. *Endocrinology* 125, 192–198. <https://doi.org/10.1210/endo-125-1-192>.
- Kumai, Y., Nesan, D., Vijayan, M.M., Perry, S.F., 2012. Cortisol regulates Na⁺ uptake in zebrafish, *Danio rerio*, larvae via the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 364, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.017>.
- Lalli, E., Alonso, J., 2010. Targeting DAX-1 in embryonic stem cells and cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 169–177. <https://doi.org/10.1517/14728220903531454>.
- Laulhé, M., Dumeige, L., Vu, T.A., Hani, I., Pussard, E., Lombès, M., Viengchareun, S., Martinier, L., 2021. Sexual dimorphism of corticosteroid signaling during kidney development. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22105275>.
- Laursen, S.B., Finsen, S., Marcussen, N., Quaggin, S.E., Hansen, P.B.L., Dimke, H., 2018. Endothelial mineralocorticoid receptor ablation does not alter blood pressure, kidney function or renal vessel contractility. *PLoS One* 13, e0193032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193032>.
- Le Billan, F., Amazit, L., Bleakley, K., Xue, Q.-Y., Pussard, E., Lhadj, C., Kolkhof, P., Viengchareun, S., Fagart, J., Lombès, M., 2018. Corticosteroid receptors adopt distinct cyclical transcriptional signatures. *FASEB J.* fj201800391RR. <https://doi.org/10.1096/fj.201800391RR>.
- Le Billan, F., Khan, J.A., Lamribet, K., Viengchareun, S., Bouligand, J., Fagart, J., Lombès, M., 2015. Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *Faseb. J.* 29, 3977–3989. <https://doi.org/10.1096/fj.15-274266>.
- Le Menuet, D., Viengchareun, S., Penforis, P., Walker, F., Zennaro, M.C., Lombès, M., 2000a. Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275, 7878–7886.
- Le Menuet, D., Zennaro, M.C., Viengchareun, S., Lombès, M., 2000b. Transgenic mouse models to study human mineralocorticoid receptor function in vivo. *Kidney Int.* 57, 1299–1306. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00966.x>.
- Lefebvre, H., Duparc, C., Naccache, A., Lopez, A.-G., Castanet, M., Louiset, E., 2019. Paracrine regulation of aldosterone secretion in physiological and pathophysiological conditions. *Vitam. Horm.* 109, 303–339. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.10.001>.
- Lema, I., Amazit, L., Lamribet, K., Fagart, J., Blanchard, A., Lombès, M., Cherradi, N., Viengchareun, S., 2017a. HuR-dependent editing of a new mineralocorticoid receptor splice variant reveals an osmoregulatory loop for sodium homeostasis. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04838-8>, 4835.
- Lema, I., Amazit, L., Lamribet, K., Fagart, J., Blanchard, A., Lombès, M., Cherradi, N., Viengchareun, S., 2017b. RNA-binding protein HuR enhances mineralocorticoid signaling in renal KC3AC1 cells under hypotonicity. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2594-x>.
- Lim, H.-Y., Müller, N., Herold, M.J., van den Brandt, J., Reichardt, H.M., 2007. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology* 122, 47–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02611.x>.
- Lim, H.-Y., van den Brandt, J., Fassnacht, M., Allolio, B., Herold, M.J., Reichardt, H.M., 2008. Silencing of the mineralocorticoid receptor by ribonucleic acid interference in transgenic rats disrupts endocrine homeostasis. *Mol. Endocrinol.* 22, 1304–1311. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0417>.
- Lindover, J.B., 2017. Water balance in the fetus and neonate. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 22, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2017.01.002>.
- Lombès, M., Claire, M., Pinto, M., Michaud, A., Rafestin-Oblin, M.E., 1984. Aldosterone binding in the human colon carcinoma cell line HT29: correlation with cell differentiation. *J. Steroid Biochem.* 20, 329–333.
- Lombès, M., Farman, N., Oblin, M.E., Baulieu, E.E., Bonvalet, J.P., Erlanger, B.F., Gasc, J.M., 1990. Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1086–1088. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.1086>.
- Lombès, M., Oblin, M.E., Gasc, J.M., Baulieu, E.E., Farman, N., Bonvalet, J.P., 1992. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ. Res.* 71, 503–510. <https://doi.org/10.1161/01.RES.71.3.503>.
- Lopez, A.-G., Duparc, C., Naccache, A., Castanet, M., Lefebvre, H., Louiset, E., 2020. Role of mast cells in the control of aldosterone secretion. *Horm. Metab. Res.* 52, 412–420. <https://doi.org/10.1055/a-1119-1063>.
- MacKenzie, S.M., van Kralingen, J.C., Davies, E., 2019. Regulation of aldosterone secretion. *Vitam. Horm.* 109, 241–263. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.07.001>.
- Martinier, L., Munier, M., Le Menuet, D., Meduri, G., Viengchareun, S., Lombès, M., 2013. The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie* 95, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.030>.
- Martinier, L., Pussard, E., Foix-L'Hélias, L., Petit, F., Cosson, C., Boileau, P., Lombès, M., 2009a. Physiological partial aldosterone resistance in human newborns. *Pediatr. Res.* 66, 323–328. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181b1bbec>.
- Martinier, L., Pussard, E., Yousef, N., Cosson, C., Lema, I., Husseini, K., Mur, S., Lombès, M., Boileau, P., 2015. Aldosterone-signaling defect exacerbates sodium wasting in very preterm neonates: the prealdo study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 4074–4081. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2272>.
- Martinier, L., Viengchareun, S., Delezoide, A.-L., Jaubert, F., Sinico, M., Prevot, S., Boileau, P., Meduri, G., Lombès, M., 2009b. Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* 150, 4414–4424. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1498>.
- Marver, D., Stewart, J., Funder, J.W., Feldman, D., Edelman, I.S., 1974. Renal aldosterone receptors: studies with (3H)aldosterone and the anti-mineralocorticoid (3H)spiro lactone (SC-26304). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1431–1435.
- Mesiano, S., Jaffe, R.B., 1997a. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev.* 18, 378–403. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.3.0304>.
- Mesiano, S., Jaffe, R.B., 1997b. Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex. *Steroids* 62, 62–72. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(96\)00161-4](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(96)00161-4).
- Miao, H., Yu, Z., Lu, L., Zhu, H., Auchus, R.J., Liu, J., Jiang, J., Pan, H., Gong, F., Chen, S., Lu, Z., 2019. Analysis of novel heterozygous mutations in the CYP11B2 gene causing congenital aldosterone synthase deficiency and literature review. *Steroids* 150. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108448>, 108448.
- Milano, E.G., Accordi, F., 1986. Evolutionary trends in adrenal gland of anurans and urodeles. *J. Morphol.* 189, 249–259. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051890304>.
- Miller, W.L., Auchus, R.J., 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* 32, 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>.
- Mirshahi, M., Mirshahi, A., Sedighian, R., Hecquet, C., Faure, J.P., Agarwal, M.K., 1997. Immunohistochemical demonstration of the mineralocorticoid receptor in ocular tissues. *Neuroendocrinology* 65, 70–78.
- Miyata, K., Rahman, M., Shokoji, T., Nagai, Y., Zhang, G.-X., Sun, G.-P., Kimura, S., Yukimura, T., Kiyomoto, H., Kohno, M., Abe, Y., Nishiyama, A., 2005. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2906–2912. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005040390>.
- Morrison, N., Harrap, S.B., Arriza, J.L., Boyd, E., Connor, J.M., 1990. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum. Genet.* 85, 130–132.
- Naccache, A., Louiset, E., Duparc, C., Laquerrière, A., Patrier, S., Renouf, S., Gomez-Sanchez, C.E., Mukai, K., Lefebvre, H., Castanet, M., 2016. Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 434, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.015>.
- Nakamura, Y., Yamazaki, Y., Konosu-Fukaya, S., Ise, K., Satoh, F., Sasano, H., 2015. Aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex and associated disorders. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 153, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.05.008>.
- Narasaka, T., Suzuki, T., Moriya, T., Sasano, H., 2001. Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174, 111–120. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00445-7](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00445-7).
- Neveux, J., Viengchareun, S., Lema, I., Lecoq, A.-L., Ferrary, E., Lombès, M., 2015. Glucocorticoids stimulate endolymphatic water reabsorption in inner ear through aquaporin 3 regulation. *Pflügers Archiv* 467, 1931–1943. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1629-5>.
- Nishiyama, A., Yao, L., Fan, Y., Kyaw, M., Kataoka, N., Hashimoto, K., Nagai, Y., Nakamura, E., Yoshizumi, M., Shokoji, T., Kimura, S., Kiyomoto, H., Tsujioka, K., Kohno, M., Yamaki, T., Kajiyama, F., Abe, Y., 2005. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension* 45, 710–716. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000154681.38944.9a>.
- Norris, D., Carr, J., 2013, fifth ed. *Vertebrate Endocrinology*. Academic press, pp. 291–315.
- Ouvrard-Pascaud, A., Sainte-Marie, Y., Bénitah, J.-P., Perrier, R., Soukaseum, C., Nguyen Dinh Cat, A., Royer, A., Le Quang, K., Charpentier, F., Demolombe, S., Mechta-Grigoriou, F., Beggah, A.T., Maison-Blanche, P., Oblin, M.-E., Delcayre, C., Fishman, G.I., Farman, N., Escoubet, B., Jaïsser, F., 2005. Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation* 111, 3025–3033. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503706>.
- Ozbaki-Yagan, N., Liu, X., Bodnar, A.J., Ho, J., Butterworth, M.B., 2020. Aldosterone-induced microRNAs act as feedback regulators of mineralocorticoid receptor signaling in kidney epithelia. *Faseb. J.* 34, 11714–11728. <https://doi.org/10.1096/fj.201902254RR>.
- Palmer, L.G., Schnermann, J., 2015. Integrated control of Na transport along the nephron. *CJASN* 10, 676–687. <https://doi.org/10.2215/CJN.12391213>.
- Pavlidis, C., McEwen, B.S., 1999. Effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors on long-term potentiation in the CA3 hippocampal field. *Brain Res.* 851, 204–214.
- Penforis, P., Viengchareun, S., Le Menuet, D., Cluzeaud, F., Zennaro, M.C., Lombès, M., 2000. The mineralocorticoid receptor mediates aldosterone-induced differentiation

- of T371 cells into brown adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E386–E394.
- Pippal, J.B., Cheung, C.M.I., Yao, Y.-Z., Brennan, F.E., Fuller, P.J., 2011. Characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 332, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.09.014>.
- Pitovski, D.Z., Drescher, M.J., Drescher, D.G., 1993. High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in the mammalian inner ear. *Hear. Res.* 69, 10–14.
- Pressley, L., Funder, J.W., 1975. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in gut mucosa. *Endocrinology* 97, 588–596. <https://doi.org/10.1210/endo-97-3-588>.
- Prunet, P., Sturm, A., Milla, S., 2006. Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.01.015>.
- Pussard, E., Travers, S., Bouvattier, C., Xue, Q.-Y., Cosson, C., Viengchareun, S., Martinierie, L., Lombès, M., 2020. Urinary steroidomic profiles by LC-MS/MS to monitor classic 21-Hydroxylase deficiency. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 198 <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105553>, 105553.
- Rafestin-Oblin, M.E., Couette, B., Radanyi, C., Lombès, M., Baulieu, E.E., 1989. Mineralocorticosteroid receptor of the chick intestine. Oligomeric structure and transformation. *J. Biol. Chem.* 264, 9304–9309.
- Rickard, A.J., Morgan, J., Tesch, G., Funder, J.W., Fuller, P.J., Young, M.J., 2009. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension* 54, 537–543. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.131110>.
- Robertson, S., Diver, L.A., Alvarez-Madrado, S., Livie, C., Ejaz, A., Fraser, R., Connell, J. M., MacKenzie, S.M., Davies, E., 2017. Regulation of corticosteroidogenic genes by MicroRNAs. *Internet J. Endocrinol.* 2017 <https://doi.org/10.1155/2017/2021903>, 2021903.
- Romagnì, P., Rossi, F., Guerrini, L., Quirini, C., Santemma, V., 2003. Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. *Atherosclerosis* 166, 345–349. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(02\)00363-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(02)00363-5).
- Rondinone, C.M., Rodbard, D., Baker, M.E., 1993. Aldosterone stimulated differentiation of mouse 3T3-L1 cells into adipocytes. *Endocrinology* 132, 2421–2426. <https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504747>.
- Ronzaud, C., Loffing, J., Gretz, N., Schütz, G., Berger, S., 2011. Inducible renal principal cell-specific mineralocorticoid receptor gene inactivation in mice. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 300, F756–F760. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00728.2009>.
- Rossier, B.C., 2016. Osmoregulation during long-term fasting in lungfish and elephant seal: old and new lessons for the nephrologist. *Nephron* 134, 5–9. <https://doi.org/10.1159/000444307>.
- Sainte Marie, Y., Toulon, A., Paus, R., Maubec, E., Cherfa, A., Grossin, M., Descamps, V., Clemessy, M., Gasc, J.-M., Peuchmaur, M., Glick, A., Farman, N., Jaisser, F., 2007. Targeted skin overexpression of the mineralocorticoid receptor in mice causes epidermal atrophy, premature skin barrier formation, eye abnormalities, and alopecia. *Am. J. Pathol.* 171, 846–860. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060991>.
- Sakamoto, T., Hyodo, S., Takagi, W., 2018. A possible principal function of corticosteroid signaling that is conserved in vertebrate evolution: lessons from receptor-knockout small fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 184, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.02.011>.
- Scholl, U.I., Goh, G., Stölting, G., de Oliveira, R.C., Choi, M., Overton, J.D., Fonseca, A.L., Korah, R., Starker, L.F., Kunstman, J.W., Prasad, M.L., Hartung, E.A., Mauras, N., Benson, M.R., Brady, T., Shapiro, J.R., Loring, E., Nelson-Williams, C., Libutti, S.K., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Åkerström, G., Björklund, P., Carling, T., Fahlke, C., Hidalgo, P., Lifton, R.P., 2013. Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat. Genet.* 45, 1050–1054. <https://doi.org/10.1038/ng.2695>.
- Scholl, U.I., Stölting, G., Nelson-Williams, C., Vichot, A.A., Choi, M., Loring, E., Prasad, M.L., Goh, G., Carling, T., Juhlin, C.C., Quack, L., Rump, L.C., Thiel, A., Lande, M., Frazier, B.G., Rasoulpour, M., Bowlin, D.L., Sethna, C.B., Trachtman, H., Fahlke, C., Lifton, R.P., 2015. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *Elife* 4, e06315. <https://doi.org/10.7554/eLife.06315>.
- Scholl, U.I., Stölting, G., Schewe, J., Thiel, A., Tan, H., Nelson-Williams, C., Vichot, A.A., Jin, S.C., Loring, E., Untiet, V., Yoo, T., Choi, J., Xu, S., Wu, A., Kirchner, M., Mertins, P., Rump, L.C., Onder, A.M., Gamble, C., McKenney, D., Lash, R.W., Jones, D.P., Chune, G., Gagliardi, P., Choi, M., Gordon, R., Stowasser, M., Fahlke, C., Lifton, R.P., 2018. CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II. *Nat. Genet.* 50, 349–354. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0048-5>.
- Schwartz, B., Wysocki, A., 1997. Mineralocorticoid receptors in the rabbit iris-ciliary body. *Ophthalmic Res.* 29, 42–47.
- Seccia, T.M., Caroccia, B., Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.E., Rossi, G.P., 2018. The biology of normal zona glomerulosa and aldosterone-producing adenoma: pathological implications. *Endocr. Rev.* 39, 1029–1056. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00060>.
- Shibata, S., Nagase, M., Yoshida, S., Kawachi, H., Fujita, T., 2007. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension* 49, 355–364. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000255636.11931.a2>.
- Sturm, A., Bury, N., Dengreville, L., Fagart, J., Flouriot, G., Rafestin-Oblin, M.E., Prunet, P., 2005. 11-deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 146, 47–55. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0128>.
- Suarez-Rivera, M., Bonilla-Felix, M., 2014. Fluid and electrolyte disorders in the newborn: sodium and potassium. *Contemp. Perspect. Rehabil.* 10, 115–122. <https://doi.org/10.2174/157339631002140513102053>.
- Suntharalingham, J.P., Buonocore, F., Duncan, A.J., Achermann, J.C., 2015. DAX-1 (NROB1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metabol.* 29, 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.07.004>.
- Teixeira, M., Viengchareun, S., Butlen, D., Ferreira, C., Cluzeaud, F., Blot-Chaubaud, M., Lombès, M., Ferrary, E., 2006. Functional Isk/KvLQT1 potassium channel in a new corticosteroid-sensitive cell line derived from the inner ear. *J. Biol. Chem.* 281, 10496–10507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512254200>.
- Travers, S., Martinierie, L., Boileau, P., Lombès, M., Pussard, E., 2018. Alterations of adrenal steroidomic profiles in preterm infants at birth. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 103, F143–F151. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-312457>.
- Travers, S., Martinierie, L., Bouvattier, C., Boileau, P., Lombès, M., Pussard, E., 2017. Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.06.005>.
- Underwood, M.A., Gilbert, W.M., Sherman, M.P., 2005. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J. Perinatol.* 25, 341–348. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211290>.
- van den Anker, J.N., de Groot, R., Broerse, H.M., Sauer, P.J., van der Heijden, B.J., Hop, W.C., Lindemans, J., 1995. Assessment of glomerular filtration rate in preterm infants by serum creatinine: comparison with inulin clearance. *Pediatrics* 96, 1156–1158.
- Van Eekelen, J.A., Jiang, W., De Kloet, E.R., Bohn, M.C., 1988. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 21, 88–94. <https://doi.org/10.1002/jnr.490210113>.
- van Weert, L.T.C.M., Buurstedde, J.C., Sips, H.C.M., Mol, I.M., Puri, T., Damsteeg, R., Roozendaal, B., Sarabdjitsingh, R.A., Meijer, O.C., 2019. Mechanistic insights in NeuroD potentiation of mineralocorticoid receptor signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 20 <https://doi.org/10.3390/ijms20071575>.
- Viengchareun, S., Kamenicky, P., Teixeira, M., Butlen, D., Meduri, G., Blanchard-Guttun, N., Kurschat, C., Lanel, A., Martinierie, L., Sztal-Mazer, S., Blot-Chaubaud, M., Ferrary, E., Cherradi, N., Lombès, M., 2009. Osmotic stress regulates mineralocorticoid receptor expression in a novel aldosterone-sensitive cortical collecting duct cell line. *Mol. Endocrinol.* 23, 1948–1962. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0095>.
- Viengchareun, S., Le Menuet, D., Martinierie, L., Munier, M., Pascual-Le Tallec, L., Lombès, M., 2007. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl. Recept. Signal.* 5, e012 <https://doi.org/10.1621/nrs.05012>.
- Viengchareun, S., Lema, I., Lamribet, K., Keo, V., Blanchard, A., Cherradi, N., Lombès, M., 2014. Hypertonicity compromises renal mineralocorticoid receptor signaling through Tis11b-mediated post-transcriptional control. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 2213–2221. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013091023>.
- Wils, J., Duparc, C., Cailleux, A.-F., Lopez, A.-G., Guiheneuf, C., Boutelet, I., Boyer, H.-G., Dubessy, C., Cherifi, S., Cauliez, B., Gobet, F., Defortescu, G., Ménard, J.-F., Louiset, E., Lefebvre, H., 2020. The neuropeptide substance P regulates aldosterone secretion in human adrenals. *Nat. Commun.* 11 <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16470-8>, 2673.
- Wotus, C., Levay-Young, B.K., Rogers, L.M., Gomez-Sanchez, C.E., Engeland, W.C., 1998. Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology* 139, 4397–4403. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6230>.
- Zennaro, M.-C., Boulkroun, S., Fernandes-Rosa, F., 2017. Genetic causes of functional adrenocortical adenomas. *Endocr. Rev.* 38, 516–537. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00189>.
- Zennaro, M.-C., Boulkroun, S., Fernandes-Rosa, F.L., 2020. Pathogenesis and treatment of primary aldosteronism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 578–589. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0382-4>.
- Zennaro, M.-C., Fernandes-Rosa, F., 2017. 30 years OF the mineralocorticoid receptor: mineralocorticoid receptor mutations. *J. Endocrinol.* 234, T93–T106. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0089>.
- Zennaro, M.C., Keightley, M.C., Kotelevtsev, Y., Conway, G.S., Soubrier, F., Fuller, P.J., 1995. Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *J. Biol. Chem.* 270, 21016–21020.
- Zennaro, M.C., Le Menuet, D., Lombès, M., 1996. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 10, 1549–1560. <https://doi.org/10.1210/mend.10.12.8961265>.
- Zennaro, M.C., Le Menuet, D., Viengchareun, S., Walker, F., Ricquier, D., Lombès, M., 1998. Hibernoma development in transgenic mice identifies brown adipose tissue as a novel target of aldosterone action. *J. Clin. Invest.* 101, 1254–1260. <https://doi.org/10.1172/JCI1915>.
- Zennaro, M.C., Souque, A., Viengchareun, S., Poisson, E., Lombès, M., 2001. A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Mol. Endocrinol.* 15, 1586–1598. <https://doi.org/10.1210/mend.15.9.0689>.
- Zhang, J., Simisky, J., Tsai, F.T.F., Geller, D.S., 2005. A critical role of helix 3-helix 5 interaction in steroid hormone receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2707–2712. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409663102>.
- Zhao, M., Célérier, I., Bousquet, E., Jeanny, J.-C., Jonet, L., Savoldelli, M., Offret, O., Curan, A., Farman, N., Jaisser, F., Behar-Cohen, F., 2012. Mineralocorticoid receptor is involved in rat and human ocular chorioretinopathy. *J. Clin. Invest.* 122, 2672–2679. <https://doi.org/10.1172/JCI61427>.
- Zoetis, T., Hurr, M.E., 2003. Species comparison of anatomical and functional renal development. *Birth Defect Res B* 68, 111–120. <https://doi.org/10.1002/dbrb.10013>.

Titre : Rôle des microARNs dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du Récepteur Minéralocorticoïde en physiologie et physiopathologie

Mots clés : Récepteur Minéralocorticoïde, Aldostérone, microARNs, Hypertonie, Période périnatale

Résumé : L'aldostérone et le Récepteur Minéralocorticoïde (MR) contrôlent la balance hydrosodée. Nous avons démontré le rôle déterminant des microARNs (miARNs) dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression rénale du MR en réponse à l'hypertonie dans les cellules rénales KC3AC1. Les miARNs 324-5p et 30c-2-3p affectent directement la stabilité du transcrite Nr3c2 (MR) et agissent de concert avec la protéine de liaison à l'ARN, Tis11b pour déstabiliser le transcrite Nr3c2 (MR) et le transcrite Elavl1 (HuR), qui code une autre protéine de liaison à l'ARN connue pour augmenter l'expression du MR. La surexpression de ces miARNs (par des lentivirus ou des Mimics) dans les cellules rénales diminue l'expression du MR et altère la sensibilité de réponse à l'aldostérone. Nous avons confirmé que leur expression est augmentée dans les reins de souris traitées par le furosémide, qui augmente la tonicité luminale relative du tubule distal.

Nous avons ensuite cherché à savoir si ce mécanisme de régulation, qui a été identifié dans des cellules rénales adultes, est pertinent durant la période périnatale, où des variations de tonicité sont observées en raison du passage de la vie

aquatique intra-amniotique à la vie extra-utérine. Nous avons d'abord montré une corrélation négative entre l'expression de ces deux miARNs avec celle du MR dans le rein de souris obtenus à différents stades embryonnaires. Ensuite, nous avons modulé l'expression de ces miARNs dans des cultures primaires de cellules rénales de souris sacrifiées à J0 et J8. Nos résultats ont montré que seule la surexpression du miR-30c-2-3p, à J8, diminue de 30% l'expression du MR, mesurée par RT-qPCR. L'impact de la surexpression du miR-30c-2-3p sur l'expression des gènes cibles du MR doit encore être étudié. Chez les nouveau-nés prématurés, l'expression rénale du MR, qui est faible à la naissance, est corrélée à une perte urinaire plus importante d'eau et de sel. La quantification de ces miARNs urinaires et leur corrélation avec la sévérité de la perte sodée indiquera si ces miARNs pourraient être utilisés comme des cibles thérapeutiques ou des biomarqueurs pronostiques, qui pourraient améliorer la prise en charge de ces enfants prématurés.

Title: Role of microRNAs in the post-transcriptional control of renal Mineralocorticoid Receptor expression in physiology and pathophysiology

Keywords: Mineralocorticoid Receptor, Aldosterone, microRNAs, Hypertonicity, Perinatal period

Abstract: Aldosterone and the Mineralocorticoid Receptor (MR) control salt and water balance. We have demonstrated the pivotal role of microRNAs (miRNAs) in the post-transcriptional control of renal MR expression in response to hypertonicity in KC3AC1 renal cells. miR-324-5p and miR-30c-2-3p directly affect the stability of the Nr3c2 (MR) transcript and act in concert with the RNA-binding protein, Tis11b to destabilize Nr3c2 (MR) transcript and Elavl1 (HuR) transcript, which encodes another RNA-binding protein known to increase MR expression. Overexpression of these miRNAs (by lentiviral particles or Mimics) in renal cells decreases MR expression and alters aldosterone response sensitivity. We confirmed that their expression is increased in the kidneys of mice treated with furosemide, which increases relative luminal tonicity in the distal tubule.

We then investigated whether this regulatory mechanism, which has been identified in adult kidney cells, is relevant during the perinatal period, where variations of tonicity are

observed due to the transition from intra-amniotic to extra-uterine life. We first showed a negative correlation between the expression of these two miRNAs with that of the MR in the kidney of mice obtained at different embryonic stages. Then, we modulated the expression of these miRNAs in primary cultures of mouse kidney cells sacrificed at D0 and D8. Our results showed that only overexpression of miR-30c-2-3p, at D8, decreased MR expression by 30% as measured by RT-qPCR. The impact of miR-30c-2-3p overexpression on the expression of MR target genes still needs to be examined. In preterm infants, low renal MR expression at birth is correlated with a greater urinary loss of water and salt. Quantification of these urinary miRNAs and correlation with the severity of sodium wasting will indicate whether these miRNAs could be used as therapeutic targets or prognostic biomarkers, which could improve the management of these preterm infants.