



# **Étude de l'expression des microARNs et des enzymes de synthèse des corticostéroïdes dans le développement pulmonaire**

**Thèse**

**Wafae Bouhaddioui**

**Doctorat en médecine moléculaire**

Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Wafae Bouhaddioui, 2016

# **Étude de l'expression des microARNs et des enzymes de synthèse des corticostéroïdes dans le développement pulmonaire**

**Thèse**

**Wafae Bouhaddioui**

Sous la direction de :

Yves Tremblay, Ph.D., directeur de recherche  
Pierre Provost, Ph.D., codirecteur de recherche

## Résumé

Le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né (SDR) est l'une des pathologies les plus fréquentes dont souffrent les bébés prématurés. Le SDR est causé par un déficit dans la synthèse du surfactant pulmonaire en raison de l'immaturation du poumon lors d'une naissance prématurée. Plusieurs éléments régulent le développement pulmonaire notamment les stéroïdes sexuels et les corticostéroïdes. Le sexe est aussi un élément régulateur du développement pulmonaire. En effet, les garçons sont plus atteints que les filles par le SDR. Ce dimorphisme sexuel est attribué aux androgènes. Le traitement anténatal aux glucocorticoïdes est prescrit aux femmes qui sont à risque d'accoucher prématurément. En effet, les corticostéroïdes favorisent la maturation pulmonaire anténatale. Également, il a été démontré que les microARNs sont primordiaux pour le développement pulmonaire. Ceci nous a conduit à étudier l'impact des androgènes sur le profil d'expression des microARNs lors de la transition du stade canaliculaire au stade sacculaire (jour gestationnel (JG)17.0 au JG18.0), période qui coïncide avec la montée de la synthèse et de la sécrétion du surfactant chez la souris. Tout d'abord, nous avons étudié la stabilité des gènes de normalisation (snoRNAs) afin de quantifier les microARNs par qPCR. Cette analyse a été effectuée avec 3 logiciels différents et sur plusieurs stades du développement notamment de la période pseudoglandulaire jusqu'au stade alvéolaire chez les deux sexes. On a identifié les meilleures combinaisons de gènes de normalisation les plus stables pour chaque stade du développement étudié ainsi que pour la période couvrant tous les stades étudiés. Ensuite nous avons analysé à GD17.0 et GD18.0 le profil d'expression des microARNs chez des fœtus mâles dont les mères ont été traitées au flutamide (anti-androgènes pure). Les résultats ont montré que 43 microARNs matures sont modulés par les androgènes à GD17.0 et 35 microARNs à GD18.0. Pour certains microARNs, nous avons identifié des cibles potentielles qui sont inversement modulées par les androgènes par rapport aux microARNs. Ces cibles sont impliquées dans plusieurs processus biologiques

tels que le métabolisme des lipides et la prolifération cellulaire ainsi que dans des fonctions moléculaires tels que la liaison des facteurs de transcription. Des expériences de validation ont été effectuées par qPCR. Nos résultats ont montré que les androgènes régulent des processus qui peuvent être impliqués dans la maturation pulmonaire via la régulation des microARNs. En plus de l'intérêt porté aux androgènes dans la maturation pulmonaire, nous avons analysé l'expression d'enzymes de synthèse des corticostéroïdes dans le poumon fœtal humain. L'expression de l'enzyme 21-hydroxylase a été étudiée par qPCR et par immunobuvardage. Également la localisation de l'ARNm de cette enzyme clé de la synthèse des glucocorticoïdes, a été effectuée par hybridation *in situ*. L'ARNm de *CYP21A2* a été détecté par qPCR dans les 34 échantillons analysés et dont les âges variaient entre 17 et 40 semaines de grossesse. Aucune corrélation, avec l'âge gestationnel ou le sexe, n'a été observée. Des niveaux significatifs de la protéine 21-hydroxylase ont été détectés dans nos échantillons. Nous avons investigué l'expression d'autres enzymes impliquées dans la voie de synthèse des glucocorticoïdes notamment *CYP11B1*, *CYP11B2* et *CYP17A1*. Les ARNm des gènes *CYP11B1*, *CYP11B2* n'ont pas été détectés dans nos échantillons, contrairement à *CYP17A1* dont l'ARNm a été détecté dans tous nos tissus fœtaux analysés. La protéine de la 17 $\alpha$ -hydroxylase a été détectée à de faibles niveaux. Nos résultats d'hybridation *in situ* ont montré que l'expression de *CYP21A2* est localisée presque exclusivement dans l'épithélium pulmonaire distal. Nos résultats suggèrent que les produits de la 21-hydroxylase agiront via une action intracrine sur l'épithélium distal en activant le récepteur des glucocorticoïdes (GR). L'activation du récepteur des minéralocorticoïdes (MR) ne semble pas dépendre de produits de la 21-hydroxylase en raison des quantités importantes d'aldostérone circulante.

## Abstract

Respiratory distress syndrome of the newborn (RDS) is one of the most common diseases affecting preterm babies. RDS is caused by a deficiency in the synthesis and secretion of pulmonary surfactant as a result of lung immaturity caused by a premature birth. Several elements and factors regulate lung development including sex steroids and corticosteroids and the sex of the infant. In fact, boys are more affected than girls by RDS. This sexual dimorphism is attributed to the presence of androgens in male lungs. In contrast, corticosteroids are given to mother at higher risk to deliver prematurely to promote antenatal lung maturation of the fetuses. As other factors, it has been shown that microRNAs are essential to lung development. This led us to study the impact of androgen on the expression profile of microRNAs in the transition period between canalicular and saccular stages (gestational day (GD)17.0 and GD18.0). This period overlap the surge of surfactant synthesis in the mouse. First, we studied the stability of normalization genes (snoRNAs) to quantify microRNAs by qPCR. This analysis was performed by 3 methods of calculation at several stages of lung development from the pseudoglandular to the alveolar stages and this for both sexes. We identified the best combinations of the most stable normalization genes for each individual developmental stage studied as well as for the period covering all the studied stages. Then, we analyzed the expression profile of microRNAs on GD17.0 and GD18.0 in male fetuses whose mothers were treated with flutamide (pure anti-androgen). The results showed that 43 mature microRNAs are modulated by endogenous androgens on GD17.0 whereas 35 microRNAs on GD18.0. We have identified some microRNAs and potential targets that are inversely modulated by androgens compared with microRNAs. These targets are involved in several biological processes such as lipid metabolism and cell proliferation as well as in molecular functions such as transcription factor binding. Validation experiments were performed by qPCR. Our results showed that androgens regulate processes that may be involved in lung maturation via the regulation of microRNAs. In addition to the interest in the impact of androgens on lung maturation, we analyzed

the expression of corticosteroid synthesis enzymes in the human fetal lung. Expression of the *CYP21A2* and the presence of its corresponding 21-hydroxylase enzyme have been studied by qPCR and immunoblot. Also mRNA localization of this key enzyme in the synthesis of glucocorticoids has been also assessed by *in situ hybridization*. *CYP21A2* mRNA was detected by qPCR in all the 34 analyzed samples, whose ages ranged between 17 and 40 weeks of pregnancy. No correlation with gestational age or sex was observed. Significant levels of 21-hydroxylase protein were detected in our samples. We investigated the expression of other enzymes involved in the pathway of glucocorticoid synthesis including *CYP11B1*, *CYP11B2* and *CYP17A1*. *CYP11B1*, *CYP11B2* mRNA were not detected in our samples, unlike *CYP17A1* whose mRNA was detected in all our analyzed fetal tissues. *CYP17A1* protein was detected at low levels. *In situ* hybridization data showed that *CYP21A2* expression is localized almost exclusively in the distal epithelium of human fetal lung. Our results suggest that 21-hydroxylase products act via an intracrine action on the distal epithelium by activating the glucocorticoid receptor (GR). Activation of the mineralocorticoid receptor (MR) at this site does not seem to depend on the 21-hydroxylase products due to the large amounts of circulating aldosterone.

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements .....	xvii
Avant-propos.....	xix
CHAPITRE I :.....	1
Chapitre I : Introduction .....	2
I-1 La prématurité.....	2
I-1-1 Les causes de la prématurité.....	2
I-1-2 Les conséquences de la prématurité .....	3
Le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né.....	6
La dysplasie bronchopulmonaire .....	8
I-2 Le développement pulmonaire .....	10
I-2-1 Les stades du développement pulmonaire.....	12
Le stade embryonnaire.....	12
Le stade pseudoglandulaire.....	13
Le stade canaliculaire .....	13
Le stade sacculaire .....	15
Le stade alvéolaire .....	15
I-3 La stéroïdogénèse.....	16
I-3-1 Voies de synthèse générales.....	16
I-3-1-1 Voie de synthèse des androgènes.....	21
<b>Le récepteur aux androgènes (AR)</b> .....	24
I-3-1-2 Voie de synthèse des corticostéroïdes.....	24
<b>I-3-1-2 Les récepteurs aux corticostéroïdes</b> .....	27
<b>Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR)</b> .....	28

<b>Le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR)</b> .....	29
I-4 Rôle des stéroïdes dans le développement pulmonaire.....	30
I-4-1 Action des androgènes sur le développement pulmonaire .....	30
Synthèse et inactivation des androgènes dans le poumon en développement.....	30
I-4-2- Action des corticostéroïdes sur le développement pulmonaire .....	33
Rôles des glucocorticoïdes sur le développement pulmonaire .....	34
Synthèse des glucocorticoïdes dans le poumon en développement .....	35
I-5 Les microARNs.....	36
I-5-1 Biogenèse et fonction des microARNs .....	37
I-5-1-1 Découverte des microARNs.....	37
I-5-1-2 Biogenèse des microARNs .....	38
<b>Voie classique de la biogenèse des microARNs</b> .....	38
<b>Voie alternative de biogenèse des microARNs</b> .....	41
I-5-1-3 Fonctions des microARNs.....	43
Inhibition de la traduction de l'ARNm cible .....	45
<b>Dégradation de l'ARNm cible</b> .....	46
<b>Activation de la traduction</b> .....	46
I-5-2 Les microARNs dans le développement pulmonaire .....	47
I-5-3 Régulation des miARNs par les stéroïdes .....	49
I-5-3-1 Régulation des miARNs par le récepteur des androgènes.....	50
I-5-3-2 Régulation des miARNs par le récepteur aux glucocorticoïdes (GR).....	51
I-5-3-3 Régulation des molécules impliquées dans la biogenèse des miARNs par les récepteurs d'hormones stéroïdiennes.....	52
I-6 Projets d'études.....	52
I-6-1 Présentation générale .....	52
I-6-2 Hypothèses.....	53
I-6-3 Objectifs.....	54
Chapitre II : Identification des gènes de normalisation pour la quantification des miARNs dans le poumon en développement chez la souris.....	55
Résumé en français de l'étude.....	56
Identification of most stable endogenous control genes for microRNA quantification in the developing mouse lung.....	58
Abstract.....	59



II-1 Introduction .....	60
II-2 Materials and Methods.....	62
II-2-1 Animals and housing .....	62
II-2-2 Fetal sex determination.....	62
II-2-3 RNA isolation.....	63
II-2-4 Reverse transcription and quantitative PCR .....	63
II-2-5 Housekeeping gene expression stability and data analysis.....	64
II-2-6 Statistics.....	65
II-3 Results and Discussion.....	65
II-3-1 Expression stability of putative endogenous control genes.....	65
II-3-2 Effect of endogenous control genes on the measure of relative Let7-a expression level .....	69
II-4 Conclusion.....	71
II-5 Acknowledgments.....	71
II-6 Figure Legends.....	72
Chapitre III: Profil d'expression des androgènes sous l'effet des androgènes dans le poumon foetal murin.....	85
Résumé en français de l'étude.....	86
Expression profile of androgen-modulated microRNAs in the fetal murine lung .....	88
Abstract.....	89
III-1 Background.....	90
III-2 Methods .....	92
III-2-1 Animals and housing .....	92
III-2-2 Fetal sex determination .....	92
III-2-3 RNA extraction and sampling .....	93
III-2-4 Microarray experiments .....	93
III-2-5 Microarray data analysis .....	94
III-2-6 Reverse transcription and quantitative PCR.....	94
III-3 Results .....	95
III-3-1 Androgen-regulated miRNA expression.....	95
III-3-2 qPCR analysis of microarray data.....	96
III-3-3 Functional analysis of androgen modulated miRNA .....	97
III-4 Discussion.....	98
III-5 Conclusions .....	104

III-6 Legends to figures .....	105
Chapitre IV: l'expression et la localisation de CYP21A2 dans l'épithélium pulmonaire humain foetal est compatible avec une production <i>in situ</i> et une action intracrine de glucocorticoïdes actifs.....	125
Résumé en français de l'étude.....	126
<i>CYP21A2</i> expression is localized in the developing distal epithelium of the human perinatal lung and is compatible with <i>in situ</i> production and intracrine actions of active glucocorticoids.....	127
Abstract.....	128
IV-1 Introduction.....	129
IV-2 Materials and Methods .....	131
IV-2-1 Human tissues .....	131
IV-2-2 RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR .....	132
IV-2-3 RNA probe synthesis and <i>in situ</i> hybridization .....	133
IV-2-4 Protein extraction and Western blot analysis .....	134
IV-2-5 Statistical analysis.....	135
IV-3 Results .....	135
IV-3-1 Analysis of <i>CYP21A2</i> , <i>CYP17A1</i> , <i>CYP11B1</i> , and <i>CYP11B2</i> gene expression in the human fetal lung.....	135
IV-3-2 Production of CYP21A2 and CYP17A1 proteins by human fetal lungs.....	136
IV-3-3 Localization of Cyp21A2 mRNA in human fetal lungs.....	137
IV-4 Discussion .....	137
IV-5 Conclusions.....	141
IV-6 Acknowledgments .....	141
Chapitre V : Discussion .....	151
V-1 Discussion complémentaire au chapitre II.....	152
V-2 Discussion complémentaire au chapitre III.....	155
V-3 Discussion complémentaire au chapitre IV .....	160
Chapitre VI : Conclusions et perspectives .....	165
VI-1 Conclusions principales relatives aux hypothèses et objectifs des projets.....	166
VI-2 Perspectives.....	168
VI-2-1 Perspectives liées à la synthèse locale des glucocorticoïdes dans le poumon en développement.....	168
VI-2-2 Perspectives liées à l'expression des miARNs dans le poumon foetal et l'effet des androgènes sur leur expression .....	170

Bibliographie..... 172

## **Liste des tables**

Table 1: Lung developmental stages and number of fetuses used.....	79
Table 2: Putative endogenous control genes and primers used for reverse transcription and qPCR.....	80
Table 3: Stability values of housekeeping gene expression in lungs at different developmental stages for each sex .....	81
Table 4: Housekeeping gene stability values in lungs at different developmental stages with both sexes combined.....	83
Table 6: Androgen-regulated miRNAs and their corresponding mRNA target(s) on GD 17.0 classified according to several biological processes .....	110
Table 7: Androgen-regulated miRNAs and their corresponding mRNA target(s) on GD 17.0 classified according to molecular functions.....	114
Table 8: Androgen-regulated miRNAs and their corresponding mRNA target(s) on GD 18.0 classified according to several biological processes .....	116
Table 9: Androgen-regulated miRNAs and their corresponding mRNA target(s) on GD 18.0 classified according to several molecular functions.....	119

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Stades du développement pulmonaire chez la souris et chez l'humain et coupe histologiques représentatives des stades pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire.....	11
<b>Figure 2:</b> structures moléculaires des stéroïdes classiques et voie de synthèse des stéroïdes.....	18
<b>Figure 3:</b> Voie de biogenèse classique des miARNs.Voie de biogenèse classique des miARNs.....	39
<b>Figure 4:</b> Voies alternatives de biogenèse des miARNs. A) Voie de biogenèse des mirtrons.....	42
<b>Figure 5:</b> Fonctions régulatrices des miARNs et les molécules impliquées. Fonctions régulatrices des miARNs et les molécules impliquées.....	44
<b>Figure 6:</b> Expression levels of putative housekeeping genes in the mouse lung at different developmental stages and in the adult lung.....	74
<b>Figure 7:</b> Determination of optimal number of reference genes for normalization.....	75
<b>Figure 8:</b> Relative expression levels of Let-7a in canalicular-stage lungs normalized with different pairs of housekeeping genes.....	76
<b>Figure 9:</b> Relative expression levels of Let-7a in saccular-stage lungs normalized with different pairs of housekeeping genes.....	77
<b>Figure 10:</b> Overview of the microarray data obtained from fetal mouse lungs exposed or not to flutamide.....	106
<b>Figure 11:</b> Validation of microarray data by qPCR for several miRNAs.....	107
<b>Figure 12:</b> Number of androgen-regulated miRNAs and their potential androgen-regulated targets according to biological processes on GD 17.0 (A) and GD 18.0.....	108
<b>Figure 13:</b> Number of androgen-regulated miRNAs and their potential androgen-regulated targets according to molecular functions on GD 17.0 (A) and GD 18.0 (B).....	109
<b>Figure 14:</b> Adrenal glucocorticoid and mineralocorticoid pathways.....	145
<b>Figure 15:</b> Expression of CYP21A2 and CYP17A1 in the human fetal lung.....	146
<b>Figure 16:</b> CYP21A2 and CYP17A1 proteins in human fetal lungs.....	147
<b>Figure 17:</b> Localization of CYP21A2 mRNA in human fetal lungs by <i>in situ</i> hybridization.....	148
<b>Figure 18:</b> GR and MR transactivation in epithelial cells expressing CYP21A2.....	149

## Liste des abréviations

**3 $\alpha$ HSD**: 3 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase  
**3 $\beta$ HSD**: 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase  
**3'UTR** : 3' untranslated region / 3'-région non traduite  
**11 $\beta$ HSD**: 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase  
**17 $\beta$ HSD**: 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase  
 **$\alpha$ -SMA**:  $\alpha$ -actine du muscle lisse ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*)  
**ACTH**: Adrénocorticotropine ou adrénocorticolibérine (*Adrenocorticotropic hormone*)  
**AR**: Récepteur des androgènes (*Androgen receptor*)  
**Ago**: Argonaute  
**ARNm**: Acide ribonucléique messager  
**AKR**: Aldo-céto réductase (*Aldo-keto reductase*)  
**Cyp11b1**: P450c11b1, 11 $\beta$ -hydroxylase  
**DGCR8**: DiGeorge syndrome critical region gene 8  
**DHEA**: Déhydroépiandrostérone  
**DHT**: Dihydrotestostérone  
**DPPC**: Dipalmitoylphosphatidilcholine  
**EGF**: Facteur de croissance épidermique (*Epidermal growth factor*)  
**FGF**: Facteur de croissance des fibroblastes (*Fibroblast growth factor*)  
**FPF**: Fibroblast-pneumonocyte factor  
**GR**: Récepteur des glucocorticoïdes (*Glucocorticoid receptor*)  
**GRE**: Élément de réponse aux glucocorticoïdes (*Glucocorticoid Responsive Element*)  
**HPA**: Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (*Hypothalamic-pituitary-adrenal axis*)  
**JG**: Jour gestationnel  
**miRNP**: MicroRNA-containing ribonucleoprotein complex  
**NADP**: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NADPH**: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite  
**P450c17**: 17 $\alpha$ -hydroxylase  
**P450c21**: 21-hydroxylase  
**CRH**: Corticolibérine (*corticotropin-releasing hormone*)  
**P450scc**: Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (*P450 cholesterol side chain cleavage*)  
**Pb**: Paire de bases  
**PCR**: Polymerase chain reaction  
**PDGF**: Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-derived growth factor*)  
**Pri-microARN** : MicroARN primaire  
**Pré-microARN**: Précurseur de microARN  
**PT**: Pneumocyte  
**RISC**: RNA-induced silencing complex  
**RNase**: Ribonucléase  
**SDR**: Syndrome de détresse respiratoire  
**Shh**: Sonic hedgehog  
**siARN**: Small interfering RNA / Petits ARNs interférons

**SnoRNA:** Small nucleolar RNA / Petits ARNs nucléolaires  
**SP:** Protéine du surfactant (*surfactant protein*)

**« La vraie science est une ignorance qui se sait. »**

(Montaigne)

*Aux bébés prématurés et à leurs parents*



## Remerciements

Cette thèse de doctorat n'a pu être réalisée sans l'aide de plusieurs personnes que je souhaite remercier particulièrement.

Tout d'abord je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr. Yves Tremblay de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens à le remercier particulièrement pour la qualité de son encadrement, pour son écoute et sa disponibilité ainsi que pour ses précieux conseils tant sur mes projets de thèse que sur mes projets d'avenir. Je le remercie également pour son enthousiasme, son optimisme et sa motivation qu'il me transmettait. Je le remercie également pour toutes les opportunités qu'il m'a offertes, en allant à plusieurs congrès scientifiques et en participant à plusieurs activités transdisciplinaires qui ont été très enrichissantes tant sur le plan scientifique que personnel. Je tiens à remercier particulièrement mon co-directeur le Dr. Pierre Provost pour la qualité de son encadrement et son importante implication dans mes projets de thèse. Je tiens à le remercier pour sa générosité à partager son savoir, pour sa disponibilité, sa patience et son ouverture d'esprit lors des échanges que nous avons sur les projets de recherches. Je le remercie également pour ses encouragements durant toutes ces années de doctorat.

Je tiens à remercier tous les membres, présents et passés, de l'équipe que j'ai pu côtoyer. Dr Éric Boucher, Dr Céline Sallon, Magaly Kaczmarczyk, Sarah Tremblay et Catherine Gilbert. Je remercie particulièrement, le Dr. Éric Boucher pour sa disponibilité et son aide. Je tiens à adresser une mention spéciale à mon amie et collègue le Dr Céline Sallon, pour tous les moments agréables qu'on a passé ensemble tant au laboratoire qu'à l'extérieur, pour nos longues discussions et pour ses encouragements pendant les moments difficiles. Je tiens à remercier également mes collègues du centre de recherche, notamment Dr Mélissa Côté et Philippe Thébault, avec qui j'ai passé de très bons moments. Je tiens à remercier mes amies, Imane, Khansaa, Nadia, Sara, Mouna et Zahira pour tout leur soutien et leurs encouragements même au-delà de l'atlantique.

Je tiens à remercier particulièrement ma famille qui sans eux je ne serai pas rendue à cette étape. D'abord un énorme merci à mes chers parents, pour leur amour inconditionnel...pour leurs encouragements continus. Je les remercie de m'avoir toujours fait sentir qu'ils sont à mes côtés même si un océan nous sépare. Je remercie du fond de

mon cœur mes frères et sœurs, Zakia, Chafik, Yacine et Sanaa. Je suis très chanceuse d'être aussi bien entourée et je les remercie énormément de leurs soutiens et de leurs encouragements.

Enfin et non pas le moindre, je tiens à remercier profondément mon conjoint, je le remercie pour son amour, pour sa présence, son écoute, son soutien et sa patience.

## Avant-propos

Les projets de recherche présentés dans cette thèse de doctorat ont fait l'objet de 3 articles scientifiques avec la contribution d'autres auteurs.

Le chapitre II présente un article publié dans le journal « *Plos One* ».

Wafae Bouhaddioui, Pierre R. Provost, and Yves Tremblay, « *Identification of the most stable endogenous control genes for microRNA quantification in the developing mouse lung* ». PLoS One. 2014; 9(11): e111855.

Cette étude a été réalisée avec la contribution des co-auteurs suivants :

**Pierre R Provost, Ph.D.** : Le Dr Provost est professeur associé au département d'obstétrique et gynécologie et de reproduction de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon co-directeur de thèse. Il a été impliqué dans la conception et le design expérimental de l'étude, l'analyse des résultats et la rédaction de l'article.

**Yves Tremblay, Ph.D.** : Le Dr Tremblay est professeur titulaire dans le département d'obstétrique et gynécologie et de reproduction de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon directeur de thèse. Il a été impliqué dans la conception et le design expérimental de l'étude, l'analyse des résultats, la rédaction de l'article et la supervision globale du projet.

Dans cette étude j'ai contribué à l'élaboration du plan du projet et le design expérimental, j'ai effectué la majorité des expériences, notamment les manipulations animales et la collecte des tissus, l'analyse par PCR quantitative, et l'analyse de la stabilité des gènes par les différents logiciels. J'ai interprété et analysé les résultats ainsi que rédigé l'article.

Le chapitre III présente un article publié dans le journal suivant « *Biology of Sex Differences* ».

Wafae Bouhaddioui, Pierre R. Provost, and Yves Tremblay « *Expression profile of androgen-modulated microRNAs in the fetal murine lung* ». *Biol Sex Differ.* 2016 Apr 1;7:20

Cette étude a été réalisée avec la contribution des co-auteurs suivants :

**Pierre R Provost, Ph.D.** : Le Dr Provost est professeur associé au département d'obstétrique et gynécologie et de reproduction de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon co-directeur de thèse. Il a été impliqué dans la conception et le design expérimental de l'étude, l'analyse des résultats et la rédaction de l'article.

**Yves Tremblay, Ph.D.** : Le Dr Tremblay est professeur titulaire dans le département d'obstétrique et gynécologie et de reproduction de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon directeur de thèse. Il a été impliqué dans la conception et le design expérimental de l'étude, l'analyse des résultats, la rédaction de l'article et la supervision globale du projet.

Dans cette étude j'ai contribué à l'élaboration du plan expérimental, j'ai effectué la majorité des expériences, notamment l'analyse et l'interprétation des résultats de microarray, les manipulations animales et la collecte des tissus ayant servi pour les expériences de qPCR. J'ai interprété et analysé les résultats ainsi que rédigé l'article.

Le chapitre IV présente un article publié dans le journal suivant « *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* ».

Wafae Bouhaddioui, Pierre R. Provost, and Yves Tremblay « *CYP21A2 expression is localized in the developing distal epithelium of the human perinatal lung and is compatible with in situ production and intracrine actions of active glucocorticoids* ».*J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Mar 19. pii: S0960-0760(16)30066-8.

Cette étude a été réalisée avec la contribution des co-auteurs suivants :

**Pierre R Provost, Ph.D.** : Le Dr Provost est professeur associé au département d'obstétrique et gynécologie et de reproduction de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon co-directeur de thèse. Il a été impliqué dans la conception et le design expérimental de l'étude, l'analyse des résultats et la rédaction de l'article.

**Yves Tremblay, Ph.D.** : Le Dr Tremblay est professeur titulaire dans le département d'obstétrique et gynécologie et de reproduction de la faculté de médecine de l'Université Laval. Il est mon directeur de thèse. Il a été impliqué dans la conception et le design expérimental de l'étude, l'analyse des résultats, la rédaction de l'article et la supervision globale du projet.

Dans cette étude j'ai contribué à l'élaboration du plan expérimental, j'ai effectué la majorité des expériences, notamment l'analyse par PCR quantitative, l'hybridation in situ, et l'immunobuvardage. J'ai interprété et analysé les résultats ainsi que rédigé l'article.

Lors de mes études doctorales j'ai eu la chance d'avoir une formation transdisciplinaire par le biais d'un forum dirigé par le Dr Yves Tremblay et dans lequel j'ai participé activement. Les échanges du forum ont abouti à la publication d'un livre électronique. Ce livre porte sur une réflexion transdisciplinaire autour de la réanimation des nouveau-nés prématurés. J'ai participé en co-auteure principale à la rédaction du chapitre portant sur une réflexion biomédicale autour des réanimations des bébés prématurés. Également, j'ai contribué à la rédaction de l'avis transdisciplinaire qui réunit tous les aspects abordés par les différents intervenants du forum. Le livre est disponible au lien présenté ci-dessous :

[http://www.fmed.ulaval.ca/prema/seuil\\_d'age\\_gestationnel\\_pour\\_la\\_reanimation\\_du\\_bebe\\_grand\\_premature.pdf](http://www.fmed.ulaval.ca/prema/seuil_d'age_gestationnel_pour_la_reanimation_du_bebe_grand_premature.pdf)

J'ai également eu l'opportunité de suivre une formation transdisciplinaire via un microprogramme interdisciplinaire en périnatalité. Cette formation enrichissante est en complémentarité avec mes études doctorales.

**CHAPITRE I :**  
**INTRODUCTION**

# Chapitre I : Introduction

## I-1 La prématurité

Une naissance prématurée est définie comme étant toute naissance survenant avant 37 semaines de gestation ([Tucker and McGuire, 2004](#)). La prématurité est un phénomène qui a persisté du début de l'humanité jusqu'à l'époque actuelle et qui a résisté à l'évolution de l'espèce humaine ainsi qu'à tous les progrès de la médecine. La définition de la prématurité est exclusive à l'espèce Homo sapiens (être humain) puisque peu de données sont disponibles chez les autres mammifères ([Phillips et al., 2015](#)). La prématurité est l'une des principales causes de la mortalité néonatale à travers le monde ([Mortality and Causes of Death, 2015](#)). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'incidence mondiale de la prématurité est en augmentation continue avec une estimation de 15 millions de naissances prématurées annuellement ([WHO, November 2015](#)). La prématurité est classée en 3 catégories selon le degré de prématurité ; la prématurité extrême quand les naissances ont lieu avant la 28<sup>ième</sup> semaine de gestation, la grande prématurité pour les naissances entre la 28<sup>ième</sup> et 32<sup>ième</sup> semaine de gestation et finalement la prématurité moyenne ou tardive pour les naissances entre la 32<sup>ième</sup> et la 37<sup>ième</sup> semaine de gestation ([WHO, November 2015](#)).

### I-1-1 Les causes de la prématurité

L'étiologie de la prématurité est complexe et multifactorielle. Plusieurs facteurs de risques connus sont d'origine maternelle notamment le tabagisme ([Andres and Day, 2000](#); [Cnattingius, 2004](#)), l'âge de la mère ([Kozuki et al., 2013](#)), les infections génitales ([Sangkomkamhang et al., 2015](#)), l'obésité ([Cnattingius et](#)



[al., 2013](#)), la pré-éclampsie ([Reveret et al., 2015](#)), la consommation d'alcool ([Albertsen et al., 2004](#)) ainsi que les grossesses multiples ([Schaaf et al., 2011](#)). D'autres facteurs sont d'origine fœtale comme les malformations congénitales ([Holmgren and Hogberg, 2001](#)). Le niveau socioéconomique de la mère joue également un rôle important dans l'incidence de la prématurité puisqu'il a été démontré que l'incidence des naissances prématurées est plus élevée chez les femmes ayant un faible niveau d'éducation et un faible revenu ([Luo et al., 2006](#); [Smith et al., 2007](#); [Thompson et al., 2006](#)). De plus, une étude récente a montré que les femmes de peau noire sont plus sujettes à des accouchements prématurés que les femmes de peau blanche ([McKinnon et al., 2016](#)).

## **I-1-2 Les conséquences de la prématurité**

Les nouveau-nés prématurés sont exposés, dès leur naissance, à plusieurs pathologies suite à l'immaturité de leurs organes qui ne sont pas encore tous adaptés à l'environnement extérieur et aux échanges gazeux.

Les bébés prématurés sont sujets à un déséquilibre des échanges trans-épidermiques, qui sont très abondants, entraînant la déshydratation et une instabilité thermique ([Afsar, 2010](#)). Le développement du tissu épidermique débute dès la 6<sup>ème</sup> semaine de grossesse et se poursuit jusqu'à la 34<sup>ème</sup> semaine ([Taeusch et al., 2005](#)). Étant immature, la peau est vulnérable aux lésions et par conséquent inapte à jouer son rôle de barrière protectrice contre les infections.

Au niveau du système gastro-intestinal, les nouveau-nés prématurés peuvent être atteints d'entérocolite nécrosante qui est une lésion intestinale aiguë provoquant l'inflammation associée à des pertes de muqueuse intestinale ([Bin-Nun et al., 2005](#)). L'entérocolite nécrosante survient chez environ 5% de l'ensemble des prématurés, et chez environ 10% des grands prématurés ([Stoll et al., 2010](#)).

Le système cardiovasculaire est également affecté lors des naissances prématurées. Pendant la grossesse, les échanges gazeux se produisent dans le placenta et le sang fœtal contourne les poumons en passant par le canal artériel qui est ouvert. Suite à la naissance à terme le canal artériel se ferme, tandis que lors d'une naissance prématurée ce canal peut demeurer ouvert. Cette persistance du canal artériel peut entraîner une insuffisance cardiaque et une diminution du flux sanguin vers les organes vitaux ([McGuire and Fowlie, 2005](#)). Cette pathologie affecte 70% des grands prématurés ([Schena et al., 2011](#)).

Le système oculaire est affecté causant une rétinopathie de la prématurité qui est une pathologie fréquente chez les bébés prématurés touchant jusqu'à 66% des extrêmes prématurés ([Sahin et al., 2014](#)). Cette pathologie est un trouble néovasculaire de la rétine. Elle est due à différents facteurs, notamment l'hypoxie et l'hyperoxie, qui entraîneront une prolifération anormale des vaisseaux sanguins ([Darlow et al., 2005](#)).

Sur le plan neuronal, plusieurs troubles sont observés chez les bébés prématurés puisque le développement neuronal se poursuit jusqu'à la fin de la gestation ([Adams-Chapman, 2006](#)). Parmi les troubles affectant le système neuronal on observe la déficience motrice cérébrale ([Himpens et al., 2008](#)), des troubles neurosensoriels tels que les déficiences visuelles d'origine périphérique ou centrale et les déficiences auditives ainsi que des troubles cognitifs et de coordination ([Arpino et al., 2010](#)). L'immatunité du système neuronal peut affecter le système respiratoire et causer des apnées suite à l'immatunité du centre de contrôle respiratoire médullaire ([Poets, 2010](#)). L'apnée du prématuré est définie comme un arrêt respiratoire au-delà de 15-20 secondes ([Moriette et al., 2010](#)). Étant immature, le centre de contrôle médullaire est vulnérable à des mécanismes d'inhibition par l'hypoxie, l'hyperthermie ou la sécrétion d'adénosine ([Lagercrantz, 1995](#)). Les nouveau-nés prématurés sont plus à risque de subir la mort subite

connue sous le nom du « syndrome de mort subite du nourrisson » ([Blair et al., 2006](#)). Il a été suggéré que ce risque de mort subite serait associé à l'immaturation du système nerveux autonome qui contrôle le rythme cardiaque et le rythme respiratoire durant le sommeil ([Horne, 2006](#)).

Il existe des traitements et des prises en charge qui réduisent les complications citées ci-haut. Notamment les méthylxanthines telles que la théophylline et la caféine sont utilisées pour le traitement de l'apnée chez les bébés prématurés. Toutefois, le traitement par la caféine est le plus recommandé car il présente moins d'effets secondaires que la théophylline ([Henderson-Smart and Steer, 2001](#)). Les bébés atteints d'entérococolite nécrosante qui ne répondent pas aux traitements par antibiotiques peuvent subir une chirurgie pour enlever le tissu intestinal nécrosé, suivie d'une stomie qui durera jusqu'à la guérison de l'intestin ([Raval and Moss, 2014](#)). Également au niveau cardiovasculaire, la persistance du canal artériel peut être traitée par médication avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens, ou par chirurgie en refermant le canal artériel ([Hamrick and Hansmann, 2010](#)).

Le système pulmonaire est également affecté lors des naissances prématurées puisque le poumon poursuit son développement jusqu'à deux ans après la naissance à terme ([Delacourt et al., 2003](#)). Le premier contact du nouveau-né avec le milieu extérieur (autre que la peau) se produit via le système respiratoire et les poumons, où le nouveau-né passe d'un milieu aqueux à un milieu gazeux. Le poumon immature est incapable à divers degrés d'accomplir les échanges gazeux, ce qui engendre des pathologies très fréquentes chez les bébés prématurés. Ces pathologies ont un impact majeur sur la mortalité liée à la prématurité ([Barber and Blaisdell, 2010](#)). Les deux pathologies respiratoires majeures dont souffrent les nouveau-nés prématurés sont le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né et la dysplasie bronchopulmonaire ([Barber and Blaisdell, 2010](#)).

## ***Le syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né***

Le syndrome de détresse respiratoire (SDR), représente l'une des physiopathologies les plus importantes et courantes dont souffrent les bébés nés prématurés (2007). Le SDR a été décrit par Avery et al en 1959 ([Avery and Mead, 1959](#)). Ce syndrome se manifeste cliniquement par la tachypnée, l'inspiration montrant les côtes sous la peau, et la cyanose ([Hermansen and Lorah, 2007](#)). La principale cause du SDR est le déficit en surfactant à la suite de l'immaturation du poumon. En effet, un déficit en surfactant entraîne un collapsus des alvéoles respiratoires et une réduction de la capacité pulmonaire ([Hermansen and Lorah, 2007](#)). La synthèse du surfactant débute vers la 24<sup>ème</sup> semaine de gestation et, jusqu'à 30 semaines, les phospholipides du surfactant n'apparaissent qu'à l'état de traces dans le liquide amniotique ([Pryhuber et al., 1991](#)). L'incidence et la sévérité du SDR diminue avec l'augmentation de l'âge gestationnel avec approximativement 92% pour les enfants nés entre 24 et 25 semaines de grossesse, 88% pour les enfants nés entre 26 et 27 semaines, 76% pour ceux nés entre 28 et 29 semaines et 57% pour les enfants nés entre 30 et 31 semaines de grossesse ([Sweet et al., 2010](#)). Il existe plusieurs facteurs de risque pour le SDR notamment l'immaturation pulmonaire, le diabète maternel / gestationnel puisque l'incidence peut être plus élevée chez les bébés dont les mères sont diabétiques ([Barnes-Powell, 2007](#)). Le sexe masculin représente également un facteur de risque puisque l'incidence et la sévérité du SDR sont plus élevées chez les garçons que les filles ([Anadkat et al., 2012](#); [Baum et al., 2000](#); [Pollak and Birnbacher, 2004](#)).

La différence sexuelle observée dans l'incidence du SDR est attribuée à un délai dans la maturation des cellules épithéliales (PTII) chez les garçons ([Torday et al., 1981](#)). Ce délai de maturation des cellules PTII se traduit en un retard de la montée de la synthèse du surfactant pulmonaire nécessaire à la fonction respiratoire lors de la vie extra-utérine ([Torday et al., 1981](#)). Ce retard de

maturation est lié à une présence des androgènes dans les poumons chez les garçons ([Seaborn et al., 2010](#)).

Le déficit en surfactant est la cause principale du SDR mais pas l'unique. En effet, il a été démontré que l'immaturation d'expression du canal épithélial ENaC, responsable du transport du sodium, mène au syndrome de détresse respiratoire ([O'Brodovich, 1996](#)) puisque la quantité d'ARNm de  $\alpha$ ENaC augmente à la fin de la gestation ([Dagenais et al., 1997](#)).

Il existe différentes approches thérapeutiques pour traiter le SDR. Les femmes à risque d'accoucher prématurément reçoivent un traitement anténatal aux glucocorticoïdes afin d'accélérer la maturation pulmonaire ([Roberts and Dalziel, 2006](#)). En postnatal, les nouveau-nés prématurés recevront un traitement au surfactant exogène en prophylaxie ainsi qu'une assistance respiratoire plus ou moins sévère selon les besoins du prématuré.

L'effet thérapeutique du traitement anténatal aux glucocorticoïdes sur la diminution de l'incidence du SDR a été démontré dès 1972 ([Liggins and Howie, 1972](#)). Cet effet a été confirmé par d'autres études qui ont montré que la corticothérapie anténatale peut réduire de 50% le risque d'atteinte par le SDR ([Hamon and Hascoet, 2001](#)). Cependant certains enfants ne répondent pas au traitement. L'effet des glucocorticoïdes est maximal si l'accouchement a lieu entre 24h et 48h après le traitement ([Roberts and Dalziel, 2006](#)). Les corticostéroïdes synthétiques les plus utilisés sont la bétaméthasone et la dexaméthasone. Le traitement à la bétaméthasone est plus favorable pour ses effets secondaires moins importants que la dexaméthasone ([Feldman et al., 2007](#)). Il est moins recommandé d'utiliser des doses multiples car c'est une approche qui soulève certaines controverses ([Crowther et al., 2015](#); [Murphy et al., 2008](#)).

Afin de compenser le déficit en surfactant, un traitement au surfactant exogène est administré aux nouveau-nés prématurés atteints de SDR. Ce traitement permet de réduire la mortalité de 30% ([Seger and Soll, 2009](#)). Il existe deux types de surfactants exogènes utilisés en clinique, les surfactants naturels et les synthétiques. Le surfactant naturel est à base de produits animaux, il est composé de protéines et de phospholipides, son profil phospholipidique est homologue au surfactant endogène. Le surfactant synthétique ne contient pas les protéines du surfactant, il contient uniquement les phospholipides, spécifiquement le dipalmitoylphosphatidilcholine (DPPC). Le surfactant naturel a une action plus rapide que le surfactant synthétique, cependant il peut déclencher une réaction immunologique ([Ramanathan, 2009](#)). Une nouvelle génération de surfactant synthétique est en développement afin de se rapprocher du surfactant naturel en contenant des analogues des protéines du surfactant ([Speer et al., 2013](#)).

La prise en charge du nouveau-né prématuré atteint du SDR nécessite également un support respiratoire qui consiste en une oxygénothérapie contrôlée par divers protocoles selon les besoins afin de soutenir le système respiratoire du nouveau-né ([Sweet et al., 2010](#)).

### ***La dysplasie bronchopulmonaire***

Cette pathologie est fréquente chez les nourrissons prématurés nés avant la 32<sup>ième</sup> semaine de grossesse et peut être définie comme étant une dépendance à l'oxygène pendant plus que 28 jours ou au-delà de 36 semaines d'âge gestationnel ([Ehrenkranz et al., 2005](#)). Il existe deux formes de dysplasie bronchopulmonaire (DBP), la forme «classique» et la forme «nouvelle», cette dernière découlant d'une simplification alvéolaire retrouvée surtout chez les prématurés en deçà de 28 semaines ([Jobe and Bancalari, 2001](#)). La DBP classique a été décrite par Northway et al en 1967, elle est rencontrée chez les nourrissons ayant souffert de SDR et ayant subi une ventilation mécanique de longue durée. Cette forme est

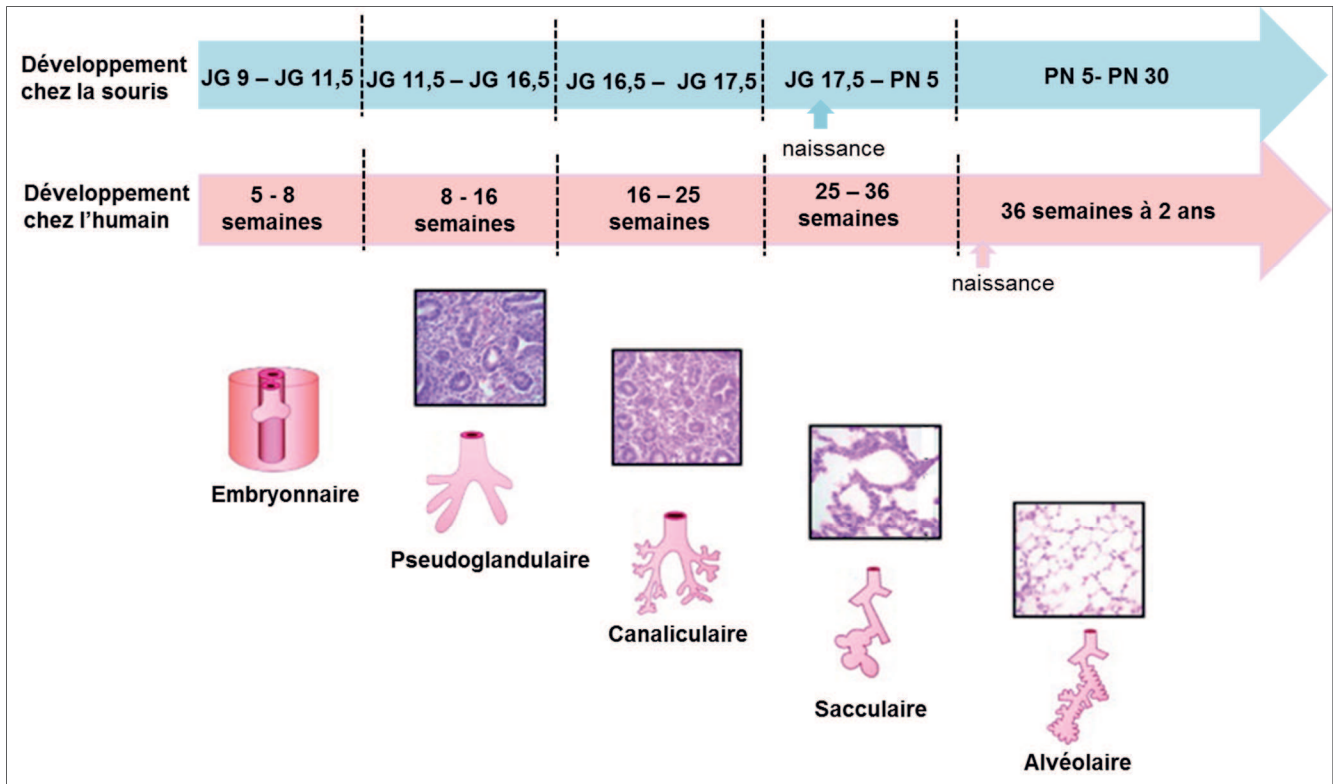
caractérisée par une inflammation sévère, formation d'œdème pulmonaire, d'une fibrose péri-bronchiale, une métaplasie de l'épithélium aérien et une croissance vasculaire anormale ([Northway et al., 1967](#)). L'incidence de la DBP classique a diminué avec l'évolution des stratégies de prise en charge des nouveau-nés prématurés ainsi qu'avec le traitement anténatal aux glucocorticoïdes ([Deakins, 2009](#)). Également, la DBP peut être observée chez les bébés prématurés qui souffrent de SDR et qui ont fait une rechute après une amélioration suite au traitement au surfactant exogène. Contrairement à cette forme classique, la nouvelle DBP est caractérisée par un arrêt du développement alvéolaire ([Deakins, 2009](#)). Elle est plus fréquente chez les prématurés extrêmes et très grands prématurés ([Jensen and Schmidt, 2014](#)). La nouvelle DBP se distingue de la forme classique par une simplification alvéolaire avec une diminution du nombre des alvéoles et une augmentation de la taille des alvéoles et une diminution de l'air de la surface d'échange ([Jobe and Bancalari, 2001](#)). Les nouveau-nés prématurés peuvent développer la DBP à différents degrés de sévérité. La DBP a été catégorisée en 3 degrés: la DBP bénigne quand l'oxygénothérapie dure 28 jours et s'arrête à moins de 36 semaines d'âge gestationnel, la DBP modérée quand l'apport d'O<sub>2</sub> est inférieur à 30% à 36 semaines d'âge gestationnel, et la DBP sévère quand l'apport d'O<sub>2</sub> est supérieur à 30% à 36 semaines d'âge gestationnel ([Deakins, 2009](#)).

Les nouveau-nés prématurés atteints de DBP sont pris en charge sur plusieurs aspects. Au niveau nutritionnel, l'apport de fluide doit être contrôlé et minimisé afin d'éviter l'augmentation du risque d'œdème pulmonaire ([Jain and Bancalari, 2014](#)). Des diurétiques sont également administrés pour diminuer les œdèmes pulmonaires ([Jain and Bancalari, 2014](#)). Sur le plan respiratoire, plusieurs protocoles de prise en charge sont utilisés notamment la ventilation en pression positive continue et la pression positive nasale intermittente, l'assistance ventilatoire ajustée à l'influx neural, ainsi que la canule nasale à haut débit d'oxygène ([Jain and Bancalari, 2014](#)).

## I-2 Le développement pulmonaire

Le développement pulmonaire fœtal débute avec la croissance de l'ébauche de l'intestin antérieur. Le bourgeon pulmonaire apparaît chez l'homme à partir du 22<sup>ième</sup> jour après la fécondation. Le développement pulmonaire se déroule en plusieurs stades, commençant au cours de la vie fœtale et se poursuivant jusqu'après la naissance. Chez la souris le développement pulmonaire commence dès le jour gestationnel 9 et se poursuit jusqu'au jour postnatal 30. Les cinq stades du développement pulmonaire tant humain que murin sont : le stade embryonnaire, le stade pseudo-glandulaire, le stade canaliculaire, le stade sacculaire et le stade alvéolaire. La description des stades du développement est semblable chez la souris et chez l'humain (figure 1) mais étant donné que la gestation chez la souris dure 19 jours versus 9 mois chez l'humain chaque stade montre des différences temporelles ([Seaborn et al., 2010](#)).





**Figure 1: Stades du développement pulmonaire chez la souris et chez l'humain et coupe histologiques représentatives des stades pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire.** Le moment de la naissance est indiqué par des flèches bleue chez la souris et rose chez l'humain correspondant au stade sacculaire et alvéolaire, respectivement. JG : jour gestationnel, PN : jour postnatal. Tirée et adaptée de ([Seaborn et al., 2010](#)).

## I-2-1 Les stades du développement pulmonaire

### ***Le stade embryonnaire***

Au cours du stade embryonnaire, l'ébauche laryngo-trachéale se forme au 26<sup>ième</sup> jour post-conception et se ramifie dans la cavité pleurale primitive. Du jour 26 au jour 28, le bourgeon pulmonaire est bifurqué en deux bourgeons primaires droit et gauche. Le bourgeon droit est plus grand que le bourgeon gauche. Deux autres ramifications suivront et seront respectivement à l'origine des lobes pulmonaires et des segments bronchiques. L'humain possède trois lobes pulmonaires droits et deux lobes pulmonaires gauches, alors que la souris possède quatre lobes droits et un lobe gauche ([Cardoso and Lu, 2006](#)).

Plusieurs molécules régulent le stade embryonnaire notamment les facteurs de transcription homéotiques (*HOX*) ([Cebra-Thomas et al., 2003](#)), l'acide rétinoïque et ses récepteurs ([Mendelsohn et al., 1994](#)), ainsi que les facteurs de croissances dérivés du mésenchyme et de l'endoderme tels que le facteur de croissance des fibroblastes *fgf10* (*fibroblast growth factor*) ([Min et al., 1998](#)). Également l'expression de certaines voies de signalisation comme celle de Wnt/ $\beta$ -caténine sont nécessaires aux premières étapes du développement pulmonaire ([Huelsken et al., 2000](#)). En effet, l'inactivation de cette voie entraîne l'absence totale de développement pulmonaire ([Pongracz and Stockley, 2006](#)). La voie des Shh (*Sonic hedgehog*) est impliquée dans la prolifération du mésenchyme ([Pepicelli et al., 1998](#)). L'absence de l'expression de Shh entraîne un retard de formation des bourgeons pulmonaires et l'incapacité à former les premières ramifications ([Litingtung et al., 1998](#)). Il a également été démontré que la protéine osseuse morphogénique 4 *bmp4* (*Bone morphogenic protein-4*) joue un rôle primordial dans la prolifération cellulaire à ce stade du développement ([Shu et al., 2005](#)).

### ***Le stade pseudoglandulaire***

Ce stade est considéré comme la phase de mise en place de l'arbre bronchique. Le stade pseudoglandulaire débute à la 8<sup>ième</sup> semaine de gestation et se poursuit jusqu'à la 16<sup>ième</sup> semaine chez l'humain, et s'étend du jour 11.5 au jour 13.5 chez la souris. Au cours de cette période l'arbre bronchique subira 16 ramifications successives aboutissant à la formation des bronchioles terminales. Parallèlement, l'arbre vasculaire se développe aussi. Durant ce stade, les cellules prismatiques de l'épithélium de l'arbre trachéo-bronchique se différencient en cellules ciliées et cellules sécrétrices. À partir de la 10<sup>ième</sup> semaine chez l'humain, les cellules mésenchymateuses se différencient en cellules cartilagineuses et musculaires lisses. Une partie de l'épithélium périphérique est maintenue indifférenciée jusqu'au stade alvéolaire ([Warburton et al., 2010](#)).

Parmi les gènes qui régulent le stade pseudoglandulaire on trouve les gènes *Hox* régulant la formation de l'arbre bronchique. Également, les voies de signalisation des BMP et FGF10 régulent la prolifération épithéliale à ce stade ([Bogue et al., 1994](#); [Zhu et al., 2004](#)). Certains facteurs de transcription comme *gata6* ou *foxa2* sont également importants pour le développement de l'épithélium ([Weidenfeld et al., 2002](#)). L'inactivation de *Gata6* au stade pseudoglandulaire permet l'augmentation de l'expression de *bmp 4* et de la voie Wnt, ce qui mène à une augmentation de la prolifération épithéliale. *Foxa2* régule également la voie Wnt et l'expression de *Shh* ([Wan et al., 2004](#)).

### ***Le stade canaliculaire***

Ce stade débute dès la 16<sup>ième</sup> semaine et se poursuit jusqu'à la 25<sup>ième</sup> semaine chez l'humain et du jour gestationnel 16,6 au jour 17,4 chez la souris. Ce stade est caractérisé par la formation de l'acinus (unité respiratoire terminale) à partir de la bronchiole terminale qui va se subdiviser en bronchioles respiratoires prolongées

par des bourgeons qui seront à l'origine des saccules. La vascularisation de l'appareil respiratoire commence à se développer et le mésoderme entourant l'acinus devient très vascularisé. Durant ce stade, les cellules de l'épithélium se différencient en cellules épithéliales cubiques et pavimenteuses de types I et II (PTI, PTII), respectivement. La formation des inclusions lamellaires (forme intracellulaire du surfactant) caractérise la différenciation des PTII ([Delacourt et al., 2003](#)). Les cellules PTI présentent des expansions cytoplasmiques étendues au contact desquelles migrent les capillaires. Elles commencent à former la barrière air/sang qui sera fonctionnelle à la fin de ce stade. À la fin de ce stade débute la sécrétion du surfactant synthétisé par les cellules PTII ([Delacourt et al., 2003](#)).

Le surfactant pulmonaire est un complexe protéo-lipidique qui joue le rôle de tensioactif pour prévenir le collapsus des alvéoles respiratoires lors de l'expiration. Il est composé de phospholipides (80%) de lipides neutres (10%) et 10% de protéines A (SP-A), B (SP-B), C (SP-C) et D (SP-D) ([Haagsman and Diemel, 2001](#); [Perez-Gil and Weaver, 2010](#)). La capacité de réduction de la tension de surface est attribuée principalement au phospholipides et plus spécifiquement au DPPC. Les molécules de DPPC peuvent être comprimées ensemble très étroitement en raison de leurs deux chaînes d'acides gras totalement saturés. Ceci va permettre d'exclure des molécules d'eau à partir de l'interface air-liquide, ce qui élimine la tension de surface ([Daniels and Orgeig, 2003](#)). Les protéines du surfactant sont synthétisées dans les cellules alvéolaires de type II. SP-A régule la sécrétion et la recapture des phospholipides dans les cellules alvéolaire de type II. Les protéines hydrophobes SP-B et SP-C interagissent avec les lipides en favorisant la formation et l'adsorption du complexe du surfactant à l'interface air-liquide. SP-A et SP-D sont principalement impliquées dans le système immunitaire inné pulmonaire ([Haagsman and Diemel, 2001](#)).

### ***Le stade sacculaire***

Le stade sacculaire s'étend de la 25<sup>ème</sup> à la 36<sup>ème</sup> semaine de grossesse chez l'humain et du jour gestationnel 17.4 au jour postnatal 5 chez la souris. Ce stade débute par un élargissement marqué des voies aériennes périphériques conduisant à une importante augmentation de la surface d'échange gazeux. L'élargissement des espaces aériens périphériques se fait par division des saccules formant le parenchyme pulmonaire primitif qui va s'amincir. Les septa intra-sacculaires, formant les cloisons des saccules, sont encore épaisses à ce stade et contiennent un double réseau capillaire. Des dépôts d'élastine se forment dans la matrice extracellulaire, ces dépôts sont primordiaux pour la formation des alvéoles. Les fibroblastes présents dans l'espace interstitiel sont responsables de la production de la matrice extracellulaire et sont impliqués dans la différenciation des cellules épithéliales ([Warburton et al., 2010](#)).

Le dépôt d'élastine par les myofibroblastes est régulé principalement par l'expression épithéliale du facteur de croissance dérivé des plaquettes *Angiopoietin-like protein 1* (*platelet-derived growth factor*) et de son récepteur *Angiopoietin-like protein 1 receptor* (*pgdfr-a*) par les myofibroblastes ([Buch et al., 1994](#)). L'initiation et la localisation de ce processus sont régulées par la voie Shh et par l'acide rétinoïque ([Kim and Vu, 2006](#)). Les voies de signalisation de FGF-10, du facteur de croissance tumoral- $\beta$  TGF- $\beta$  (*Tumor growth factor  $\beta$* ), de BMP-4, et Wnt sont également impliquées dans l'arborisation au stade sacculaire ([Alejandro-Alcazar et al., 2008](#)). VEGF-A est exprimé dans les cellules épithéliales distales et joue un rôle dans la vasculogénèse ([Akeson et al., 2005](#)).

### ***Le stade alvéolaire***

Ce stade débute à 36 semaines de grossesse chez l'humain. Au cours de ce stade, les premières alvéoles matures apparaissent. Elles sont caractérisées par des septa interalvéolaires minces et un réseau capillaire unique suite à la fusion du

double réseau de capillaire. Le diamètre des capillaires est suffisamment grand pour recouvrir les parois des alvéoles et interagir avec deux lumières alvéolaires. De nouvelles alvéoles sont produites par un processus de subdivision à partir de la croissance des septa présents dans les alvéoles immatures existantes. Cette production d'alvéoles matures se poursuit jusqu'à l'âge de deux ans ([Delacourt et al., 2003](#)). Avec la maturation des alvéoles et l'amincissement des parois, la proportion du stroma par rapport au volume pulmonaire total diminue. À 2 ans, la morphologie globale du poumon est établie et l'expansion ultérieure se produit avec une croissance proportionnelle de tous les composants du poumon jusqu'à l'âge adulte. Le nombre total d'alvéoles dans un poumon mature se situe entre 300 et 600 millions à raison de 1000 alvéoles par acinus approximativement ([Thurlbeck, 1982](#)).

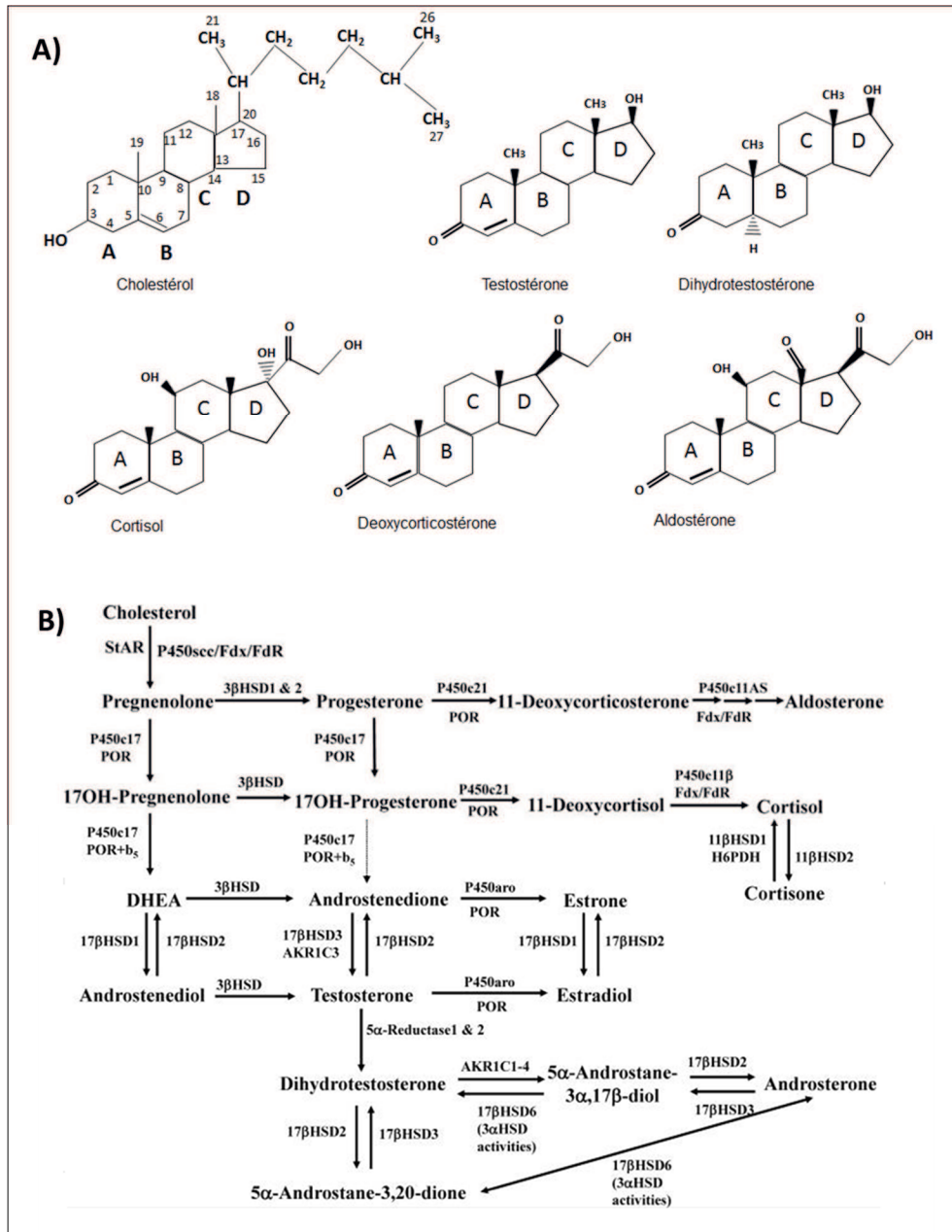
### **I-3 La stéroïdogénèse**

En plus des gènes impliqués dans le développement pulmonaire cités dans la section précédente, les stéroïdes sont d'un grand intérêt dans la maturation du poumon et ils constituent le thème central de mon projet de doctorat. À cet effet les éléments de base sur la stéroïdogénèse et son implication dans le développement pulmonaire seront présentés dans les sections suivantes.

#### **I-3-1 Voies de synthèse générales**

La stéroïdogénèse mène à la synthèse des différentes hormones stéroïdiennes : les androgènes, les estrogènes, les progestines ainsi que les corticostéroïdes (glucocorticoïdes) et minéralocorticoïdes. La stéroïdogénèse commence avec le cholestérol qui a la même structure squelettique que les hormones stéroïdiennes et qui est caractérisée par un noyau cyclopentanophénanthrénique composé de 4 cycles, 3 cycles à 6 carbones et un cycle à 5 carbones (A, B, C, D). La synthèse des différents types de stéroïdes est dépendante de l'expression des enzymes de synthèse. La figure 2 présente la voie de synthèse générale incluant les différentes hormones stéroïdiennes chez l'humain et chez la souris. Les voies de synthèse des androgènes et des

corticostéroïdes seront détaillées dans les sections suivantes étant donné leur importance dans ce projet de doctorat.



**Figure 2:** structures moléculaires des stéroïdes classiques et voie de synthèse des stéroïdes. **A)** Structures moléculaires du cholestérol et de stéroïdes sélectionnés, les 4 cycles A, B, C et D forment le noyau stérane. **B)** Voies classiques de la synthèse des androgènes, estrogènes et des corticostéroïdes et identification des enzymes impliquées. Panneau (B) tiré de ([Miller and Auchus, 2011](#))



Le cholestérol nécessaire pour synthétiser les stéroïdes provient principalement de la circulation ou de réserves lipidiques cellulaires ([Carr and Simpson, 1981](#); [Gwynne and Strauss, 1982](#)). La première étape de la stéroïdogénèse se déroule dans la mitochondrie, où le cholestérol doit être transporté de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne. La protéine StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) facilite ce transport dans tous les tissus excepté le placenta et le cerveau ([Sugawara et al., 1995](#)). La transcription de StAR est activée par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) dans les glandes surrénales, par l'hormone lutéinisante (LH) dans les cellules de Leydig et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) dans les cellules de granulosa ([Stocco et al., 2005](#)). StAR est uniquement active quand elle est localisée dans la membrane mitochondriale extérieure tandis qu'elle est inactive dans la membrane intérieure ou dans la matrice ([Bose et al., 2002](#)). StAR possède un site de liaison aux stérols qui ne peut accueillir qu'une seule molécule de cholestérol ([Tsujishita and Hurley, 2000](#)). Afin d'accepter et de larguer la molécule de cholestérol, StAR subira des changements de conformation dans la membrane mitochondriale extérieure ([Baker et al., 2005](#); [Bose et al., 1999](#)). StAR interagit également avec le récepteur périphérique des benzodiazépines nommé aussi la protéine de translocation (*Translocator protein, TSPO*) pour le transport du cholestérol à travers la membrane mitochondriale ([Lacapere and Papadopoulos, 2003](#)).

Une fois que le cholestérol a traversé la membrane mitochondriale il sera converti en prégnénolone via l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (cytochrome P450<sub>scc</sub>). Cette première réaction est importante pour la synthèse de toutes les hormones stéroïdiennes. Il a été démontré qu'aucune synthèse de stéroïdes n'est observée dans un tissu exempt de l'expression de P450<sub>scc</sub> ([Hu et al., 2002](#); [Kim et al., 2008](#); [Tajima et al., 2001](#); [Yang et al., 1993](#)). La transformation du cholestérol en prégnénolone se déroule en trois étapes successives : la 22-hydroxylation du cholestérol, la 20-hydroxylation du 22-hydroxycholestérol et, finalement, le clivage du lien C20-22 du 20,22-

hydroxycholestérol. L'enzyme P450<sub>scc</sub> est codée par le gène *CYP11A1* localisé sur le chromosome humain 15 et le chromosome 9 chez la souris.

Suite à la synthèse de la prégnénolone, plusieurs réactions enzymatiques suivront afin de produire les différentes classes d'hormones stéroïdiennes. Deux types d'enzymes interviennent dans la stéroïdogénèse : les enzymes appartenant à la famille des cytochromes P450 et les enzymes appartenant à la famille des hydroxystéroïdes déshydrogénases. Les enzymes de la famille cytochrome P450 contiennent 500 acides aminés et un seul groupe hème. Ces enzymes sont caractérisées par un shift du pic d'absorbance passant de 420 à 450 nm dans le spectre UV quand elles sont à l'état réduit et sont complexées avec le monoxyde de carbone, d'où la désignation P450. Chez l'humain il existe 57 enzymes P450, 7 d'entre elles sont localisées dans la mitochondrie et sont classées de type 1. Les 50 enzymes restantes sont localisées dans le réticulum endoplasmique et sont classées de type 2. Les enzymes de type 1 reçoivent les électrons du NADPH via la flavoprotéine nommée ferrédoxine réductase et la protéine fer-souffre ferrédoxine. Les enzymes de type 2 reçoivent les électrons du NADPH via la protéine P450 oxydoréductase ([Miller, 2005](#)). Parmi les enzymes P450, 6 sont impliquées dans la stéroïdogénèse. Dans la mitochondrie, ce sont les enzymes P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c11β</sub> et l'enzyme P450<sub>c11AS</sub> alors que dans le réticulum endoplasmique on trouve l'enzyme P450<sub>c17</sub>, l'enzyme P450<sub>c21</sub> et l'enzyme P450 aromatasase. Les enzymes hydroxystéroïdes déshydrogénases nécessitent les cofacteurs NADH/NAD<sup>+</sup> ou NADPH/NADP<sup>+</sup> pour réduire ou oxyder un stéroïde. Les enzymes déshydrogénases utilisent le NAD<sup>+</sup> comme cofacteur pour oxyder les 17-hydroxystéroïdes en 17-cétostéroïdes. Les enzymes réductases utilisent le NADPH pour réduire les 17-cétostéroïdes en 17-hydroxystéroïdes. Les enzymes hydroxystéroïdes déshydrogénases sont classés en deux catégories : les enzymes déshydrogénases/ réductases à courte chaîne (SDR) et les enzymes aldo-céto réductase (AKR). Les enzymes SDR comprennent les enzymes 11β-HSD 1 et 2 et les enzymes 17β-HSD de type 1 à 14, sauf le type 5 qui fait partie de la famille des AKR.

### I-3-1-1 Voie de synthèse des androgènes

La voie de la synthèse des androgènes diffère entre l'humain et les rongeurs. En effet, chez l'humain et d'autres primates la synthèse se déroule par la voie  $\Delta^5$  via le déhydroépiandrostérone (DHEA) alors que chez les rongeurs la synthèse se déroule par la voie  $\Delta^4$ . Ces réactions sont accomplies via l'enzyme P450c17. L'enzyme P450c17 est codée par le gène *CYP17A1* localisé sur le chromosome 10. L'enzyme P450c17 catalyse deux types de réactions : la  $17\alpha$ -hydroxylation et la 17,20-lyase. L'enzyme P450c17 a une action  $17\alpha$ -hydroxylase tant sur la prégnénolone que sur la progestérone. La prégnénolone est convertie en 17-hydroxyprégnénolone et la progestérone est convertie en 17-hydroxyprogestérone. L'activité 17,20-lyase de l'enzyme P450c17 mène à la formation du DHEA à partir du 17-hydroxyprégnénolone chez l'humain et à la formation de l'androstènedione à partir de la 17-hydroxyprogestérone chez les rongeurs et l'humain également. Cependant chez l'humain, l'activité 17,20-lyase sur la 17-hydroxyprégnénolone est plus importante que celle sur la 17-hydroxyprogestérone menant à de fortes concentrations de DHEA ([Auchus et al., 1998](#); [Lee-Robichaud et al., 1995](#)).

Le DHEA formé chez l'humain sera converti par l'enzyme  $3\beta$ -HSD qui catalyse à la fois la conversion du groupe hydroxyle en groupe céto sur le carbone 3 et l'isomérisation du double lien du cycle B ( $C5=C6$ ) au cycle A ( $C4=C5$ ) ( $\Delta^5$  au  $\Delta^4$ ). L'enzyme  $3\beta$ -HSD peut convertir la prégnénolone en progestérone, la  $17\alpha$ -hydroxyprégnénolone en 17-hydroxyprogestérone, le DHEA en androstènedione et l'androstènediol en testostérone. Il faut noter que chez les rongeurs il n'y a pas de synthèse de DHEA en circulation ([van Weerden et al., 1992](#); [Wong et al., 1995](#)). Il existe 6 isoformes de l'enzyme  $3\beta$ -HSD encodées par 6 gènes chez les rongeurs alors que chez l'humain il n'existe que deux gènes actifs, notamment,  $3\beta$ -HSD de types 1 et 2. L'enzyme  $3\beta$ -HSD1 catalyse des réactions dans le placenta, le foie, le cerveau et d'autres tissus alors que le type 2 est principalement actif dans la

surrénale et les gonades ([Lachance et al., 1990](#); [Lorence et al., 1990](#); [Rheume et al., 1991](#); [Simard et al., 2005](#)).

La prochaine étape dans la synthèse des androgènes c'est l'intervention des enzymes 17 $\beta$ -HSDs. Il existe 14 types d'enzymes appartenant à la famille des 17 $\beta$ -HSDs. Le DHEA sera converti en androstènediol via l'enzyme 17 $\beta$ -HSD1 qui est une enzyme réductive à courte chaîne. L'enzyme 17 $\beta$ -HSD1 est codée par le gène *HSD17B1* situé sur le chromosome 17. L'activité principale de l'enzyme 17 $\beta$ -HSD1 est la conversion de l'estrone en estradiol chez l'humain ([Luu-The et al., 1995](#)). Chez la souris, la 17 $\beta$ -HSD1 convertit l'estrone en estradiol et l'androstènedione en testostérone ([Tremblay and Provost, 2013](#)). La 17 $\beta$ -HSD2 est une enzyme oxydative qui inactive les androgènes et les estrogènes en 17-kétostéroïdes inactifs ([Peltoketo et al., 1999](#)). La 17 $\beta$ -HSD3 est l'enzyme 17 $\beta$ -HSD qualifiée d'androgénique exprimée presque exclusivement dans les testicules ([Geissler et al., 1994](#)). La 17 $\beta$ -HSD3 convertit l'androstènedione en testostérone, la 5 $\alpha$ -androstanédione en dihydrotestostérone (DHT) et l'androstérone en 5 $\alpha$ -androstanediol. La 17 $\beta$ -HSD4 a une activité stéroïdogénique faible qui est similaire à la 17 $\beta$ -HSD2 ([Adamski et al., 1995](#)). La 17 $\beta$ -HSD5 est une enzyme AKR nommée aussi AKR1C3. Elle catalyse la réduction de l'androstènedione en testostérone ([Dufort et al., 1999](#); [Lin et al., 1997](#)). La 17 $\beta$ -HSD5 est exprimée tant dans les tissus stéroïdogéniques que les non-stéroïdogéniques ([Deyashiki et al., 1994](#); [Dufort et al., 1999](#)). La 17 $\beta$ -HSD6, correspondant à 17 $\beta$ -HSD9 chez la souris, est une enzyme capable de convertir des 3 $\alpha$ -hydroxystéroïdes en 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes avec une activité 3 $\alpha$ -HSD ([Chetyrkin et al., 2001](#); [Huang and Luu-The, 2000](#)). La 17 $\beta$ -HSD6 peut convertir le 5 $\alpha$ -androstanediol en DHT ([Miller and Auchus, 2011](#)), l'estradiol en estrone ([Biswas and Russell, 1997](#); [Marijanovic et al., 2003](#)) et le 5 $\alpha$ -androstanédione en androstérone ([Miller and Auchus, 2011](#)). La 17 $\beta$ -HSD7 est exprimée dans plusieurs tissus et peut convertir l'estrone en estradiol, et participe également dans la synthèse du cholestérol ([Breitling et al., 2001](#); [Nokelainen et al., 1998](#)). Les 17 $\beta$ -HSD8 et 11 participent dans l'inactivation des androgènes et des estrogènes ([Ando et al., 1996](#); [Brereton et al., 2001](#); [Fomitcheva et al., 1998](#)). Les

17 $\beta$ -HSD10, 12 et 14 sont impliquées dans l'inactivation des androgènes et des estrogènes, mais également dans le métabolisme des acides gras ([Luu-The et al., 2006](#); [Shafqat et al., 2003](#); [Sivik et al., 2012](#)).

Une des étapes importante dans la formation des androgènes est la conversion de la testostérone en DHT via l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase. Cette enzyme existe en deux types 1 et 2. L'enzyme 5 $\alpha$ -réductase de type 1 est exprimée dans plusieurs tissus périphériques et est encodée par le gène *SRD5A1* situé sur le chromosome 5 alors que la 5 $\alpha$ -réductase de type 2 est prédominante dans les tissus reproducteurs et est encodée par le gène *SRD5A2* localisé sur le chromosome 2. Les deux types de 5 $\alpha$ -réductase peuvent avoir plusieurs autres substrats que la testostérone notamment les stéroïdes C21 ([Frederiksen and Wilson, 1971](#)).

Les androgènes formés peuvent être convertis en estrone ou en estradiol via l'enzyme P450 aromatase. Cette enzyme peut convertir la testostérone en estradiol ou convertir l'androstènedione en estrone. La P450 aromatase est codée par le gène *CYP19A1* situé sur le chromosome 15. L'enzyme P450 aromatase catalyse la déméthylation oxydative des stéroïdes C19, notamment l'androstènedione et la testostérone en stéroïdes C18 avec un cycle aromatique A.

Il a été démontré chez les marsupiaux et chez l'humain que la synthèse de DHT peut passer par une voie non classique sans passer par les produits intermédiaires androstènedione et testostérone. La progestérone ou la 17-hydroxyprogestérone sont 5- $\alpha$  réduits, les produits seront réduits par la 3 $\alpha$ -HSD ce qui mène à la formation d'allopregnanolone et 17 $\alpha$ -hydroxyallopregnanolone. Ce dernier sera clivé en androstérone qui sera oxydé en DHT via l'activité de la 17 $\beta$ -HSD6 ([Auchus, 2004](#)).

## **Le récepteur aux androgènes (AR)**

AR est codé par le gène *NR3C4* localisé sur le chromosome X et composé de 8 exons. La protéine AR est composée de 3 domaines : le domaine NTD, encodé par le premier exon, le domaine DBD encodé par les exons 2 et 3, et le domaine LBD encodé par les exons 4 à 8. Le domaine NTD comprend deux sites d'initiation, ce qui mène à deux isoformes nommés AR-A et AR-B. L'isoforme AR-A est une protéine tronquée en N-terminale alors que l'isoforme AR-B est l'isoforme codant pour la protéine AR pleine longueur constituée de 919 acides aminés ([Tan et al., 2015](#)). Les deux importants ligands endogènes d'AR sont la testostérone et le dihydrotestostérone (DHT). Le DHT diffère de la testostérone par l'absence du double lien dans le cycle A, ce qui augmente son affinité de liaison à AR de 2 fois par rapport à la testostérone. AR est exprimé dans plusieurs tissus tels que la peau, le foie, les reins, le cerveau et le poumon ([Pelletier, 2000](#); [Tremblay and Provost, 2013](#)).

Contrairement aux agonistes d'AR, les anti-androgènes sont des ligands qui empêchent l'action des androgènes par compétition sur les sites de liaison d'AR. Il existe deux types d'anti-androgènes : stéroïdiens et non-stéroïdiens. Les premiers sont très peu utilisés en clinique à cause de leurs effets secondaires. Les anti-androgènes non stéroïdiens comme le flutamide sont des dérivés de la toluidine ([Helsen et al., 2014](#)). Le flutamide est un anti-androgène pur exempt d'effet androgénique et utilisé cliniquement pour le traitement du cancer de la prostate. *In vivo*, l'enzyme CYP1A2 convertit le flutamide en 2-hydroxyflutamide qui entre en compétition avec la testostérone et le DHT pour lier AR ([Shet et al., 1997](#)).

### ***I-3-1-2 Voie de synthèse des corticostéroïdes***

Il existe deux types de corticostéroïdes : Les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes. La synthèse des glucocorticoïdes débute avec la conversion

de la 17-hydroxyprégnénolone en 17-hydroxyprogestérone via l'enzyme  $3\beta$ -HSD. Tandis que la prégnénolone est convertie en progestérone par la  $3\beta$ -HSD pour la synthèse des minéralocorticoïdes. La voie de synthèse classique se déroule dans la glande surrénalienne où la synthèse des glucocorticoïdes se déroule dans la zone fasciculée alors que la synthèse des minéralocorticoïdes se déroule dans la zone glomérulée. Les principaux rôles des glucocorticoïdes sont le maintien de l'homéostasie du glucose ([Dallman et al., 1993](#)) et la coordination de la réponse au stress avec des actions anti-inflammatoires et immunosuppressives ([Sapolsky et al., 2000](#)). Le rôle principal des minéralocorticoïdes concerne l'homéostasie du sodium en contribuant à la réabsorption du sodium et l'excrétion du potassium, contrôlant ainsi la pression artérielle ([Tomaschitz et al., 2010](#)).

La progestérone ou la 17-hydroxyprogestérone seront converties respectivement en 11-déoxycorticostérone ou en 11-déoxycortisol via une enzyme primordiale à la synthèse des corticostéroïdes qui est l'enzyme microsomale P450c21 nommée aussi 21-hydroxylase. La 21-hydroxylase mène à la formation du 11-déoxycortisol chez l'humain et du 11-déoxycorticostérone (DOC) chez les rongeurs pour la synthèse des glucocorticoïdes. Le DOC a également une fonction minéralocorticoïde connue ([Pippal and Fuller, 2008](#)). L'enzyme P450c21 est encodée par le gène humain *CYP21A2* localisé sur le chromosome 6. Il existe également un pseudogène inactif *CYP21A1P* localisé à proximité du gène actif et dont la transcription ne mène pas à l'expression de la P450c21. *CYP21A1P* est non codant en raison de 11 mutations dans la région codante ([Lee, 2014](#)). Contrairement à l'humain, chez la souris le gène actif est le gène *Cyp21a1* et le pseudogène est le gène *Cyp21a2* localisés sur le chromosome 17. Le locus de l'enzyme P450c21 est l'un des plus complexes dans le génome humain étant donnée l'expression de plusieurs éléments autres que le gène de la 21-hydroxylase ([Speek et al., 1996](#)). Le locus de P450c21 se trouve au milieu du locus de l'antigène leucocytaire humain (HLA) III où on trouve *C4A* et *C4B* encodant le 4<sup>ème</sup> élément du complément et qui sont dupliqués en tandem avec P450c21 et son pseudogène ([Morel et al., 1989](#); [Wijesuriya et al., 1999](#)). Au moins

6 autres gènes se trouvent dans le même locus que la 21-hydroxylase. En plus de *C4A* et *C4B* localisés sur le même brin que *CYP21A2*, on trouve la paire de gènes Tenascin X *TNXA* (*XA*) et *TNXB* (*XB*) localisés sur le brin opposé à la *CYP21A2* ([Bristow et al., 1993](#); [Tee et al., 1995](#)), des transcrits non codants d'ARN nommés YA et YB ([Bristow et al., 1993](#)) provenant du promoteur de *CYP21A2*, ainsi que des transcrits ZA et ZB ([Tee et al., 1995](#)) provenant de l'intron 35 des gènes *C4* et dont peu d'éléments sont connus sur leur transcription. Chez la souris, la paire de gènes *Tnxa* et *Tnxb* sont également localisés sur le brin opposé à la *Cyp21a1* alors que *C4a* est localisé sur le même brin ([Riepe et al., 2005](#)) .

Il est également intéressant à noter que les stéroïdes C21 peuvent être réduits par la 5 $\alpha$ -réductase. Le produit 5 $\alpha$ -réduit du DOC est le 5  $\alpha$ -DH-DOC, ce dernier peut lier et activer AR ([Nixon et al., 2012](#)).

Les produits de la 21-hydroxylase seront convertis par l'enzyme mitochondriale P450c11 $\beta$  encodée par le gène *CYP11B1* situé sur le chromosome 8. L'enzyme P450c11 $\beta$  catalyse la conversion du 11-déoxycortisol en cortisol, le glucocorticoïde actif chez l'humain, et la conversion du 11-déoxycorticostérone en corticostérone, le glucocorticoïde actif chez les rongeurs. Le cortisol une fois formé peut être converti en cortisone via l'activité oxydative de l'enzyme 11 $\beta$ HSD2. L'activité de la 11 $\beta$ HSD2 ne nécessite qu'une faible concentration de cortisol. Également chez les rongeurs, la 11 $\beta$ HSD2 inactive la corticostérone en 11-déshydrocorticostérone. L'inactivation des glucocorticoïdes actifs par la 11 $\beta$ HSD2 permet de protéger le récepteur des minéralocorticoïdes afin de laisser place à l'aldostérone pour exercer son rôle de minéralocorticoïdes de manière spécifique car les glucocorticoïdes peuvent lier et activer le récepteur des minéralocorticoïdes (MR). La DOC sera inactivée par l'activité 20 $\alpha$ -HSD de la 17 $\beta$ -HSD type 5 pour protéger le récepteur des minéralocorticoïdes. On note également qu'au début de la grossesse, le cortisol maternel permet d'inactiver l'axe HPA foetal pour permettre à la surrénale foetale d'acquérir sa maturité. Par la suite, l'expression de la 11 $\beta$ HSD2 dans le placenta inactivera le cortisol maternel afin de lever l'inhibition



de l'axe HPA fœtal et permettre la synthèse de glucocorticoïdes fœtaux ([Provost et al., 2013](#)). Cependant les formes inactives peuvent être réactivées par l'enzyme 11 $\beta$ HSD1. Cette enzyme catalyse la réduction de la cortisone en cortisol chez l'humain et la réduction du 11-déshydrocorticostérone en corticostérone chez les rongeurs. Contrairement à l'activité de l'enzyme 11 $\beta$ HSD2, celle de la 11 $\beta$ HSD1 nécessite des concentrations élevées de stéroïdes. La synthèse du surfactant est affectée chez les souris 11 $\beta$ HSD1<sup>-/-</sup> qui montrent une réduction dans la synthèse des lipides du surfactant ainsi qu'une diminution de l'expression de SP-A ([Hundertmark et al., 2002](#)).

La synthèse des minéralocorticoïdes se déroule via l'enzyme P450c11AS nommée aldostérone synthase. Cette enzyme est encodée chez l'humain par le gène *CYP11B2* qui est localisé dans le même locus que le gène *CYP11B1*. Cette enzyme catalyse la conversion du 11-désoxycorticostérone en aldostérone via trois activités : 11 $\beta$ -hydroxylase, 18-hydroxylase et 18-méthyloxidase.

### **I-3-1-2 Les récepteurs aux corticostéroïdes**

Les corticostéroïdes exercent leurs actions physiologiques comme glucocorticoïdes ou comme minéralocorticoïdes via le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR), respectivement. Cependant, dans plusieurs circonstances, MR sera protégé d'une action des glucocorticoïdes par des enzymes d'inactivations des glucocorticoïdes. Ces deux récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires d'hormones.

## ***Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR)***

GR est encodé par le gène *NR3C1* situé sur le chromosome 5. Quand GR est inactif il réside dans le cytoplasme à l'intérieur d'un complexe multimérique. Suite à la liaison du ligand, GR se dissocie de ses chaperonnes pour aller vers le noyau. GR peut également exercer des fonctions non génomiques en se liant non spécifiquement aux membranes cellulaires ([Stahn and Buttgerit, 2008](#)). Cependant les deux formes, active et inactive de GR, peuvent être en constante mouvance entre le noyau et le cytoplasme. GR est exprimé dans plusieurs tissus tels que le foie ([Patel et al., 2014](#)), le cerveau ([Saaltink and Vreugdenhil, 2014](#)) et les poumons ([Provost et al., 2013](#); [Pujols et al., 2004](#)). GR actif exerce une activité transcriptionnelle en se liant sur des séquences d'ADN nommées GRE (glucocorticoid responsive element) se trouvant dans les régions promotrices des gènes. GR comprend 9 exons et l'initiation de la traduction se produit à l'exon 2. L'exon 9 subit de l'épissage alternatif résultant en deux isoformes GR $\alpha$  et GR $\beta$ , GR $\alpha$  étant la forme majoritaire. Au niveau de l'exon 2, il existe 8 sites d'initiation de la traduction, ce qui résulte en 8 isoformes de GR $\alpha$  (GR $\alpha$  –A à D3) avec des domaines N-terminaux tronqués. La forme GR $\alpha$ -A est la forme classique de la protéine GR pleine longueur. GR $\beta$  possède un court domaine de liaison au ligand, ce qui l'empêche de lier les glucocorticoïdes. Cependant il est localisé dans le noyau et a une activité transcriptionnelle intrinsèque, d'autant plus que le mifepristone (RU-486), antagoniste de GR, est capable de le lier. GR $\beta$  peut également agir comme un dominant négatif de GR $\alpha$  en inhibant son activité.

GR est une protéine de 777 acides aminés organisés en 3 domaines. Le premier domaine est nommé NTD et est formé par les premiers 421 acides aminés de la région N-terminale. Le domaine NTD (amino terminal domain) est nécessaire à l'activation transcriptionnelle de GR. Le deuxième domaine est appelé DBD (DNA-binding domain) et se trouve dans la région centrale de la protéine. Le domaine DBD est composé de deux doigts de zinc qui jouent un rôle important dans la dimérisation de GR et son interaction avec ses cofacteurs. DBD est

important à la liaison de GR aux GREs. Le troisième domaine appelé LBD (ligand-binding domain) est composé de 251 acides aminés et est localisé dans la région C-terminale. Le domaine LBD joue un rôle important dans la capacité de GR à lier ses ligands ([Caratti et al., 2015](#)).

### ***Le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR)***

MR est encodé par le gène *NR3C2* situé sur le chromosome humain 4. *NR3C2* est composé de 10 exons et 8 introns. Les deux premiers exons, 1 $\alpha$  et 1 $\beta$  situés dans la région 5'-UTR, réfèrent à MR $\alpha$  et MR $\beta$ . Les 8 autres exons encodent pour la protéine entière qui est composée de 984 acides aminés. Il a été démontré que le gène *NR3C2* encode pour plusieurs isoformes provenant d'épissages alternatifs. La protéine MR contient les mêmes domaines que GR : le domaine NTD est composé de 602 acides aminés, le domaine DBD est identique à celui de GR à 94% et le domaine LBD est composé de 251 acides aminés. MR est capable de former des hétérodimères avec d'autres récepteurs tels que GR et AR ([Liu et al., 1995](#); [Savory et al., 2001](#)).

MR peut être activé par l'aldostérone, par la DOC, et par le cortisol chez l'humain ou la corticostérone chez les rongeurs. Les glucocorticoïdes ont une affinité de liaison semblable à l'aldostérone pour MR. Les taux plasmatiques de cortisol sont 100 à 1000 fois plus élevés que l'aldostérone. L'expression de l'enzyme 11 $\beta$ HSD2 permet de protéger MR des glucocorticoïdes pour assurer sa sélectivité aux minéralocorticoïdes. MR est également protégé de la DOC par l'activité 20 $\alpha$ -HSD de la 17 $\beta$ -HSD5. MR est exprimé dans l'épithélium de plusieurs tissus tels que les reins ([Krozowski et al., 1989](#)), le colon ([Pressley and Funder, 1975](#)), les poumons ([Krozowski and Funder, 1981](#)), les testicules ([Le Menuet et al., 2000](#)) et la peau ([Kenouch et al., 1994](#)). D'autres tissus non épithéliaux peuvent également exprimer MR tels que le cœur ([Ouvrard-Pascaud et al., 2005](#)) et le cerveau ([Han et al., 2005](#); [Krozowski and Funder, 1981](#)).

## **I-4 Rôle des stéroïdes dans le développement pulmonaire**

### **I-4-1 Action des androgènes sur le développement pulmonaire**

Le syndrome de la détresse respiratoire du nouveau-né est caractérisé par un dimorphisme sexuel, puisque l'incidence est plus élevée chez les garçons que les filles ([Baum et al., 2000](#); [Pollak and Birnbacher, 2004](#)). Ce dimorphisme sexuel est attribué aux androgènes qui sont fortement produits chez les garçons par rapport aux filles. Il a été observé que les androgènes retardent la maturation pulmonaire en retardant la synthèse de surfactant. En effet le traitement à l'anti-androgène flutamide chez le lapin rétablit les niveaux de surfactant chez les mâles à des niveaux similaires aux femelles ([Nielsen et al., 1982](#)). Chez le modèle de souris *tfm* (*testicular feminized mice*), ayant AR non fonctionnel, les niveaux de surfactants sont supérieurs aux femelles ([Nielsen, 1985](#)) .

Cependant les androgènes peuvent également avoir un effet positif sur la maturation pulmonaire et précisément dans les premiers stades du développement. En effet il a été démontré sur des explants de poumons que le traitement à la DHT stimule l'arborisation du poumon avec une augmentation de la prolifération épithéliale ([Levesque et al., 2000](#)).

### ***Synthèse et inactivation des androgènes dans le poumon en développement***

Le métabolisme des androgènes dans le poumon fœtal a été étudié dans des modèles cellulaires ainsi qu'*in vivo* ([Tremblay and Provost, 2013](#)). Notamment, il a été étudié dans les cellules pulmonaires A549 ([Lieber et al., 1976](#)). Ces cellules ont conservé certaines caractéristiques des cellules épithéliales de type II, notamment en sécrétant le surfactant et en exprimant AR ([Lieber et al., 1976](#)). En présence d'androstènedione, ces cellules pulmonaires ont produit fortement la testostérone et moins le 5 $\alpha$ -androstènediol, l'androstérone et le DHT

([Provost et al., 2000](#)). Il a également été démontré que les ARNm des enzymes 17 $\beta$ -HSD-5 et 3 $\alpha$ -HSD3 étaient produits dans ce type cellulaire. Le DHEA est converti en androstènediol via l'activité de l'enzyme 17 $\beta$ -HSD-5 sans conversion significative en androstènedione suggérant une très faible activité de l'enzyme 3 $\beta$ -HSD. Ces cellules sont donc capables de produire de la testostérone à partir du précurseur androstènedione ( $\Delta^4$ ) mais non à partir du DHEA. L'enzyme 5 $\alpha$ -réductase type 2 n'est pas exprimée contrairement à la 5 $\alpha$ -réductase type 1 pour laquelle de très faibles niveaux d'ARNm ont été détectés ([Provost et al., 2002](#)). Également, le DHT est rapidement inactivé en 5 $\alpha$ -androstaniol dans cette lignée cellulaire. En conclusion des résultats de ces premières études menées sur ce modèle cellulaire, les cellules pulmonaires A549 sécrètent la testostérone et métabolisent rapidement le 5 $\alpha$ -DHT. Ainsi le DHT est synthétisé pour amplifier l'action intracrine de la testostérone. D'un point de vue paracrine la testostérone est l'androgène actif dans ce type cellulaire ([Provost et al., 2000](#)). L'expression d'autres enzymes a également été étudiée dans ce modèle cellulaire. La 17 $\beta$ -HSD4 et la 3 $\beta$ -HSD1 ont été détectées contrairement aux enzymes 17 $\beta$ -HSD1 à 3 et l'enzyme 3 $\alpha$ -HSD1 ([Provost et al., 2000](#)).

Des études ont également été menées in vivo afin d'analyser l'expression des enzymes d'activation et d'inactivation des androgènes. Il a été démontré que le récepteur aux androgènes est exprimé de façon stable en gestation du jour 15.5 au jour 18.5 sans présenter de différence d'expression entre les deux sexes ([Provost et al., 2004](#)). Également il a été montré que l'expression des deux enzymes 17 $\beta$ -HSD2 et 17 $\beta$ -HSD5 augmente au jour 17.5, cette augmentation coïncide avec l'augmentation de la protéine du surfactant SP-C. Des différences sexuelles variables ont été observées dans certaines portées ([Provost et al., 2004](#)). Ces différences varient d'une portée à une autre et peuvent être soit en faveur ou en défaveur du mâle. Également au jour 15.5, les niveaux d'expression de ces deux enzymes sont plus élevés qu'au jour 16.5 chez les femelles uniquement ([Provost et al., 2004](#)). Également, une autre étude a montré que l'expression de la 17 $\beta$ -HSD2 diminue entre le stade sacculaire et le stade

alvéolaire ([Boucher et al., 2009](#)). Ces fluctuations des niveaux d'expression de ces enzymes d'activation et d'inactivation de la testostérone suggèrent que le poumon en développement subit des changements dans la pression androgénique pendant cette courte fenêtre gestationnelle. Dans des lignées de cellules fibroblastiques, la 17 $\beta$ -HSD2 est également exprimée suggérant l'inactivation de la testostérone en androstènedione dans ce type cellulaire ([Provost et al., 2002](#)).

Une autre étude *in vivo* a porté sur l'expression des enzymes de synthèse et d'inactivation du DHT notamment la 5 $\alpha$ -réductase type 1 et la 3 $\alpha$ -HSD type 1, respectivement. Les niveaux d'expression de la 5 $\alpha$ -réductase type 1 sont stables du jour 15.5 au jour 18.5 contrairement à ceux de la 3 $\alpha$ -HSD qui présentent une forte augmentation à partir du jour 17.5 et se maintiennent en hausse jusqu'au jour 18.5. L'ARNm de la 3 $\alpha$ -HSD a été suggéré comme marqueur de maturité pulmonaire chez la souris étant donné sa forte augmentation au jour 17.5 coïncidant avec la maturation des cellules PTII ([Provost and Tremblay, 2007](#)).

En plus des études portées sur l'expression des ARNm des enzymes de synthèse et d'inactivation des androgènes, d'autres études ont été menées afin de déterminer leur(s) localisation(s) cellulaire(s). L'enzyme 17 $\beta$ -HSD2 est observée dans le mésenchyme, et dans la totalité des cellules épithéliales distales et proximales qui réfèrent respectivement aux zones respiratoires et aux voies aériennes en développement. La 17 $\beta$ -HSD2 était clairement apicale dans les cellules épithéliales distales. Le signal positif pour la 17 $\beta$ -HSD2 a été détecté tant au niveau de la protéine par immunohistochimie qu'au niveau de l'ARNm par hybridation *in situ* dans la majorité des cellules du mésenchyme ([Plante et al., 2009](#)).

La localisation d'AR a également été étudiée par immunohistochimie. AR est situé principalement dans les cellules épithéliales, et également dans certaines cellules du mésenchyme. AR n'est pas détectable dans les cellules qui expriment

$\alpha$ -SMA et qui entourent les voies aériennes proximales. Également, un signal nucléaire pour AR a été observé dans certaines cellules épithéliales des voies aériennes proximales, quelques cellules épithéliales distales ainsi que quelques cellules  $\alpha$ -SMA positives entourant les artères. La localisation nucléaire d'AR implique qu'il a été activé dans ces cellules ([Plante et al., 2009](#)).

Une autre étude in vivo analysant l'expression d'AR, de la 17 $\beta$ -HSD2 et de la 17 $\beta$ -HSD5 a été effectuée sur des poumons fœtaux humains provenant de bébés prématurés décédés et dont les âges étaient situés entre la 17<sup>ème</sup> et la 40<sup>ème</sup> semaine de gestation ([Simard et al., 2010](#)). Ces enzymes ont été détectées dans l'ensemble des échantillons. Cette étude a montré que les niveaux d'ARNm des enzymes 17 $\beta$ -HSD2 et la 17 $\beta$ -HSD5 augmentaient avec l'augmentation de l'âge gestationnel contrairement à AR qui montre une corrélation inverse. Également, la localisation de ces enzymes a été investiguée dans ces tissus humains. La 17 $\beta$ -HSD2 et AR sont localisés dans les cellules épithéliales distales et proximales ainsi que dans quelques cellules du mésenchyme. La 17 $\beta$ -HSD5 n'a été détectée que dans un nombre relativement restreint de cellules épithéliales proximales ([Simard et al., 2010](#)).

#### **I-4-2- Action des corticostéroïdes sur le développement pulmonaire**

Comme plusieurs tissus, le poumon répond à l'action des corticostéroïdes. Les taux de glucocorticoïdes augmentent durant la fin de la gestation en coïncidant avec le pic de synthèse du surfactant chez plusieurs espèces ([Jung et al., 2011](#)). Cette hausse des glucocorticoïdes implique plusieurs effets sur le développement pulmonaire.

## ***Rôles des glucocorticoïdes sur le développement pulmonaire***

La première étude qui a démontré le rôle important des glucocorticoïdes sur le développement pulmonaire a été effectuée par Liggins en 1969 ([Liggins, 1968, 1969](#)). Il a démontré que le traitement anténatal des brebis gestantes aux glucocorticoïdes accélérât la synthèse du surfactant. Suite à ces résultats, plusieurs autres études ont été effectuées, in vivo et in vitro, démontrant l'effet positif des glucocorticoïdes sur la maturation pulmonaire([Grier and Halliday, 2004](#)).

Également des études ont été réalisées sur des modèles animaux chez lesquels la synthèse des glucocorticoïdes est altérée. Chez le modèle de souris CRH-KO qui n'exprime pas l'hormone corticolibérine (CRH) ([Muglia et al., 1999](#)), les souriceaux CRH<sup>-/-</sup> provenant de parents homozygotes décèdent après leur naissance suite à des complications respiratoires. L'hormone CRH stimule l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien qui régule la synthèse des glucocorticoïdes. Cette étude a donc montré que les glucocorticoïdes sont importants pour la maturation pulmonaire.

D'autres études ont été menées chez des souris GR-KO n'exprimant pas le récepteur aux glucocorticoïdes. Les souris GR-KO décèdent également après leur naissance suite à des problèmes respiratoires ([Cole et al., 1995](#)). Les poumons des souris GR-KO<sup>-/-</sup> sont caractérisés par l'hypercellularité du mésenchyme et l'épaississement des septa ([Cole et al., 1995](#)). Également les niveaux d'ARNm de protéines du surfactant SP-A et SP-C ont diminué de 50% chez les souris GR-KO<sup>-/-</sup> ([Cole et al., 1995](#)). Il a été également démontré chez le rat adulte que le traitement aux glucocorticoïdes augmentait l'expression des protéines du surfactant SP-A, SPB et SP-C ainsi que le nombre de corps lamellaires ([Young et al., 1991](#); [Young and Silbajoris, 1986](#)).



D'autres changements touchant la structure pulmonaire ont été observés suite au traitement anténatal aux glucocorticoïdes, notamment l'amincissement des parois alvéolaires et l'élongation des septa secondaires ([Willet et al., 2001](#)). Ainsi, toutes ces études montrent que les glucocorticoïdes accélèrent la maturation pulmonaire. En clinique, les glucocorticoïdes sont prescrits aux femmes qui sont à risque d'accoucher prématurément pour prévenir les complications respiratoires dont peuvent souffrir les nouveau-nés prématurés.

### ***Synthèse des glucocorticoïdes dans le poumon en développement***

Les glucocorticoïdes sont synthétisés principalement par les glandes surrénaliennes et sont distribués aux autres tissus via la circulation systémique. Cependant plusieurs études ont montré que certains tissus périphériques pouvaient synthétiser de novo les glucocorticoïdes. Parmi ces tissus extra-surréaliens on trouve la peau, le cerveau, l'intestin, le thymus et le cœur ([Cima et al., 2004](#); [Lechner et al., 2000](#); [MacKenzie et al., 2000](#); [Pazirandeh et al., 1999](#); [Vukelic et al., 2011](#)).

Connaissant la sensibilité du poumon aux glucocorticoïdes et leurs rôles dans la maturation pulmonaire, le poumon en développement peut également être un tissu extra-surrénalien synthétisant de novo les glucocorticoïdes. En effet une étude a montré que les ARNm des enzymes de synthèse des glucocorticoïdes sont exprimés dans le poumon murin fœtal aux jours gestationnels 15.5 à 17.5 hormis le messager de l'enzyme 11 $\beta$ -hydroxylase qui n'est pas détectable au-delà du jour 15.5 ([Boucher et al., 2014](#); [Provost and Tremblay, 2005](#)).

Également, il a été démontré que *P450scc*, *3 $\beta$ hsd1* et *cyp21a1* sont exprimées du jour gestationnel 15.5 au jour postnatal 15 ([Boucher et al., 2014](#)). La protéine 21-hydroxylase a été détectée également du jour gestationnel 15.5 au jour postnatal 16 ([Boucher et al., 2014](#)). Il est intéressant de savoir que la

progestérone, substrat de la 21-hydroxylase, est également présente durant la gestation et que la désoxycorticostérone, produit de la 21-hydroxylase, est un agoniste de GR. Cette étude a également montré l'expression d'une autre enzyme, la 20 $\alpha$ -HSD, dont le rôle est moins connu dans le mécanisme d'action des glucocorticoïdes. L'ARNm de la 20 $\alpha$ -HSD est détecté du jour gestationnel 15.5 au jour postnatal 15 avec une forte augmentation de son expression après la naissance ([Boucher et al., 2014](#)). L'enzyme 20 $\alpha$ -HSD a comme rôle d'inactiver la progestérone ainsi que le désoxycorticostérone, ce qui suggère que sa présence peut diminuer les niveaux de progestérone provenant de la circulation mais également diminuer l'occupation de GR. Les résultats de cette étude renforcent l'hypothèse que le poumon en développement peut synthétiser de novo les glucocorticoïdes. Une autre étude sur le métabolisme des stéroïdes C21, au cours du développement anténatal et postnatal, suggère un modèle d'action paracrine et intracrine des glucocorticoïdes dans le poumon ([Boucher et al., 2015](#)). Ce modèle propose que la désoxycorticostérone produite peut avoir une action intracrine en se liant sur GR ou avoir une action sur une cellule voisine n'exprimant pas la 20 $\alpha$ -HSD ([Boucher et al., 2015](#)). Cette étude a permis d'observer la formation de glucocorticoïdes actifs dans des explants de poumon et des cultures primaires de cellules épithéliales ([Boucher et al., 2015](#)). Également une forte activité 20 $\alpha$ -HSD a été détectée après la naissance, ce qui peut être expliqué par une protection contre des niveaux élevés des glucocorticoïdes après la naissance. De fortes concentrations de glucocorticoïdes peuvent altérer le développement alvéolaire. Les données de ces études sont à la base du chapitre IV de cette thèse.

## **I-5 Les microARNs**

En plus de tous les éléments connus qui régulent le développement pulmonaire, de nouvelles molécules s'ajoutent à cette complexe régulation. Les ARN non codants (ncRNAs) ont été longtemps considérés comme des acides nucléiques n'ayant aucun rôle et qualifiés de déchets. La famille des ncRNA est

subdivisée en deux groupes les petits ncRNAs (microARNs, siARNs, snoARNs, piARNs, etc) et les long ncRNAs (LncARNs). L'intérêt sera porté sur les microRNA (miRNAs) qui seront étudiés dans les chapitres II et III de cette thèse

## **I-5-1 Biogenèse et fonction des microARNs**

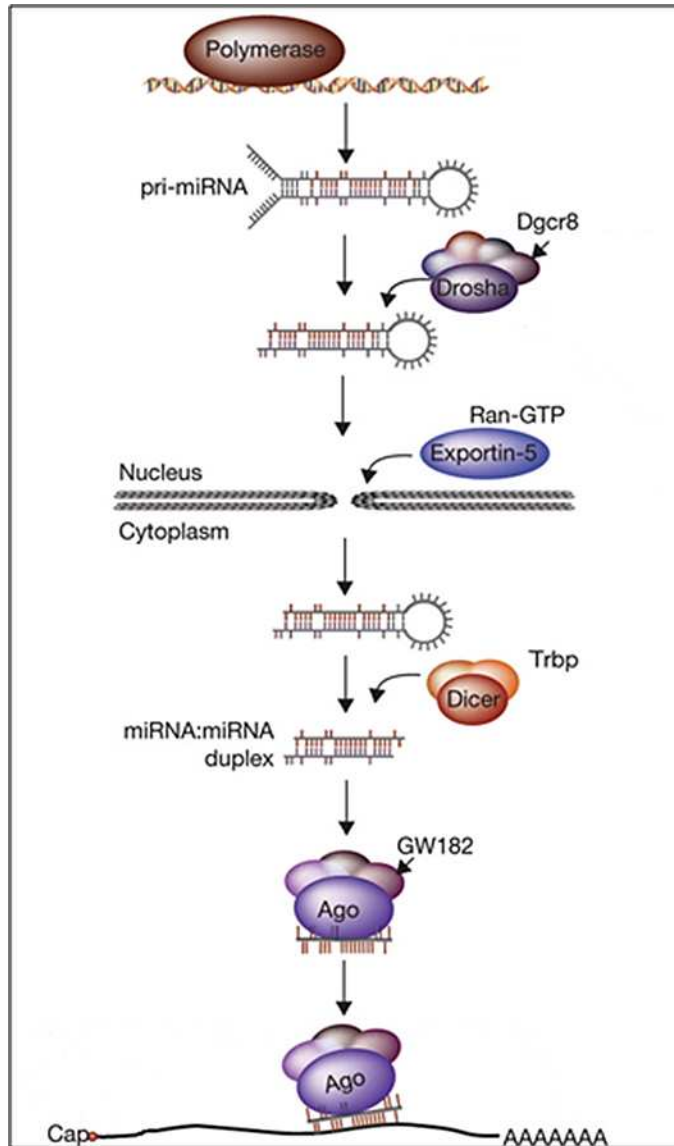
### ***I-5-1-1 Découverte des microARNs***

Les premières études qui ont montré que les petits ARN jouent un rôle dans la régulation génique ont été effectuées en 1993 ([Lee et al., 1993](#); [Wightman et al., 1993](#)). Ces études ont montré que *lin-4*, qui est connu pour la régulation négative du gène *lin-14* chez *C. elegans*, n'était pas un gène codant, mais plutôt un petit ARN qui a une complémentarité avec le 3'UTR de *lin-14*. Ils ont également démontré, par transfert Northern et des tests de protection à la RNase, que les produits du gène *lin-4* sont deux petits ARN d'une taille de 61 et 22 nucléotides (nt) respectivement. Ils ont identifié des nucléotides à la terminaison 3' de *lin-4* ayant une complémentarité avec 7 sites de liaison dans la région 3'UTR de *lin-14* ([Wightman et al., 1993](#)). Cette étude a suggéré que la régulation négative de *lin-14* s'effectuait via ces sites de liaison ([Wightman et al., 1993](#)). Le deuxième petit ARN, *let-7*, a été découvert en 2000 ([Reinhart et al., 2000](#)). *Let-7* régule également *lin-14* et *lin-41* chez *C.elegans*, mais contrairement à *lin-4*, *let-7* est conservé à travers les espèces ([Pasquinelli et al., 2000](#)). Ces petits ARN ont été d'abord nommés petits ARN temporels (small temporal RNAs, stRNAs) ([Lau et al., 2001](#)). D'autres études ultérieures ont montré qu'il existe dans le génome des mammifères plusieurs petits ARNs regroupés sous le nom de microARNs ([Lagos-Quintana et al., 2001](#); [Lagos-Quintana et al., 2003](#); [Lagos-Quintana et al., 2002](#)).

## ***I-5-1-2 Biogenèse des microARNs***

### **Voie classique de la biogenèse des microARNs**

Le mécanisme d'interférence à l'ARN (ARNi) médié par des petits ARNs double brins a été découvert en 1998 ([Fire et al., 1998](#)). Plusieurs miARNs sont localisés en cluster sur le génome et sont généralement transcrits à partir de la même unité de transcription polycistronique ([Ozsolak et al., 2008](#)). Les miARNs proviennent d'unités de transcription codantes ou non-codantes. À peu près 40% des miARNs sont localisés dans les régions introniques et 10% dans les régions exoniques des transcrits non-codants, et 40% dans les régions introniques des transcrits codants. Il existe également des miARNs qui peuvent provenir des régions introniques ou des régions exoniques suite à un épissage alternatif. La figure 3 illustre la voie classique de biogenèse des miARNs ([Liang et al., 2009](#)).



**Figure 3: Voie de biogenèse classique des miARNs.** Voie de biogenèse classique des miARNs. Au niveau du noyau, le gène du miRNA est transcrit en pri-miARN par une enzyme ARN polymérase de type II. Ensuite le complexe Drosha/Dgcr8 clive le pri-miARN en pré-miARN qui sera transporté vers le cytoplasme par Exportin-5. Dans le cytoplasme, Dicer clive le pré-miARN en un duplexe de miARNs matures. Un des miARN mature sera associé au complexe RISC afin d'exercer sa fonction régulatrice sur l'ARNm. Tirée et adaptée de ([Seila and Sharp, 2008](#))

La majorité des miARNs sont transcrits par l'enzyme ARN polymérase II. Les miARNs sont transcrits en un précurseur primaire (pri-miARN). Le pri-miARN est un long ARN contenant plusieurs structures en tige-boucle. La première étape de maturation fait intervenir un complexe nommé microprocesseur. Ce complexe est formé d'une enzyme, Drosha, qui est une RNase III et d'un cofacteur, *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8). Les structures tige-boucle sont reconnues par le complexe et sont clivées. DGCR8 s'associe au pri-miARN via deux domaines de liaison permettant à Drosha de cliver la tige du pri-miARN. Suite à cette première étape de maturation, le précurseur pré-miARN est formé. Le pré-miARN a une structure en épingle à cheveux (hairpin) et une taille de ~70 nt ([Han et al., 2006](#)).

La deuxième étape de maturation se déroule dans le cytoplasme. À cet effet le pré-miARN doit être transporté du noyau vers le cytoplasme. Ce transport est effectué suite à l'association du pré-miARN à un complexe composé d'Exportin-5-Ran-GTP ([Lund et al., 2004](#)). Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est intégré dans un complexe composé de l'endonucléase Dicer, qui est une RNase III, et un cofacteur qui peut être *TAR RNA binding protein* (TRBP) ou *protein kinase RNA activator* (PACT) ([Chendrimada et al., 2005](#)). Le pré-miARN sera clivé au niveau de la boucle du hairpin, ce qui mènera à la formation d'un duplexe de miARNs matures d'une taille de ~21-23 nt. L'enzyme Dicer a été identifiée en 2001 ([Bernstein et al., 2001](#)). Cette enzyme est un élément clé dans la voie classique de biogenèse des miARNs. Dicer est une protéine complexe de 220 kDa qui contient plusieurs domaines notamment le domaine PAZ (Piwi-Argonaut-Zwille), deux domaines RNase III et un domaine de liaison à l'ARN double brin. Les pré-miARNs sont reconnus par le domaine PAZ ([MacRae et al., 2007](#)). Le clivage par Dicer nécessite des cofacteurs. TRBP est le premier cofacteur identifié. Il se lie au domaine N-terminal de Dicer. TRBP permet à Dicer de cliver précisément le pré-miARN. Comme TRBP, PACT est un autre cofacteur qui permet à Dicer le clivage précis du pré-miARN ([MacRae et al., 2007](#)).

## Voie alternative de biogenèse des microARNs

La biogenèse des miARNs peut également passer par des voies indépendantes du microprocesseur ou du complexe de maturation Dicer. La figure 4 schématise les voies alternatives de biogenèse.

Les mirtrons sont des miARNs dont la biogenèse est indépendante du microprocesseur. Les mirtrons proviennent de courts hairpins introniques avec des sites d'épissage à chaque extrémité et dont la séquence du pré-miARN correspond exactement à la séquence de l'intron. Ces courts hairpins introniques sont excisés par le spliceosome. Après l'intervention d'une enzyme de débranchement, le hairpin épissé sera libéré de sa structure en lasso, puis se repliera en structure secondaire d'hairpin ressemblant au pré-miARN. Ces mirtrons sont reconnus par l'exportin 5 qui va les transporter vers le cytoplasme où ils subiront la maturation par la voie classique de Dicer ([Berezikov et al., 2007](#); [Ruby et al., 2007](#)).

Le pré-miR-320 a récemment été découvert. C'est un pré-miARN dont la biogenèse est indépendante du microprocesseur, mais également dont le transport vers le cytoplasme n'est pas effectué par l'exportine 5. C'est l'exportine 1 qui exporte le pré-miR-320 au cytoplasme où il subit une étape de maturation par Dicer résultant en un seul brin d'ARN mature qui est le brin 3p ([Xie et al., 2013](#)).

En 2010 une autre voie de biogenèse a été identifiée. Cette voie est dépendante du microprocesseur mais indépendante de Dicer. C'est le cas du miR-451. Ce miARN provient du brin 5' de la tige et également de la boucle du hairpin. La tige du pré-miR-451 est trop courte pour qu'elle soit clivée par l'endonucléase Dicer. Des études ont montré que Argonaute 2 (Ago2), reconnue initialement pour son implication dans la fonction des miARNs, est responsable du clivage du pré-miR-451 en un ARN de 30 nt, qui est ensuite clivé par une exonucléase afin de générer le miRNA mature et fonctionnel ([Cheloufi et al., 2010](#)).

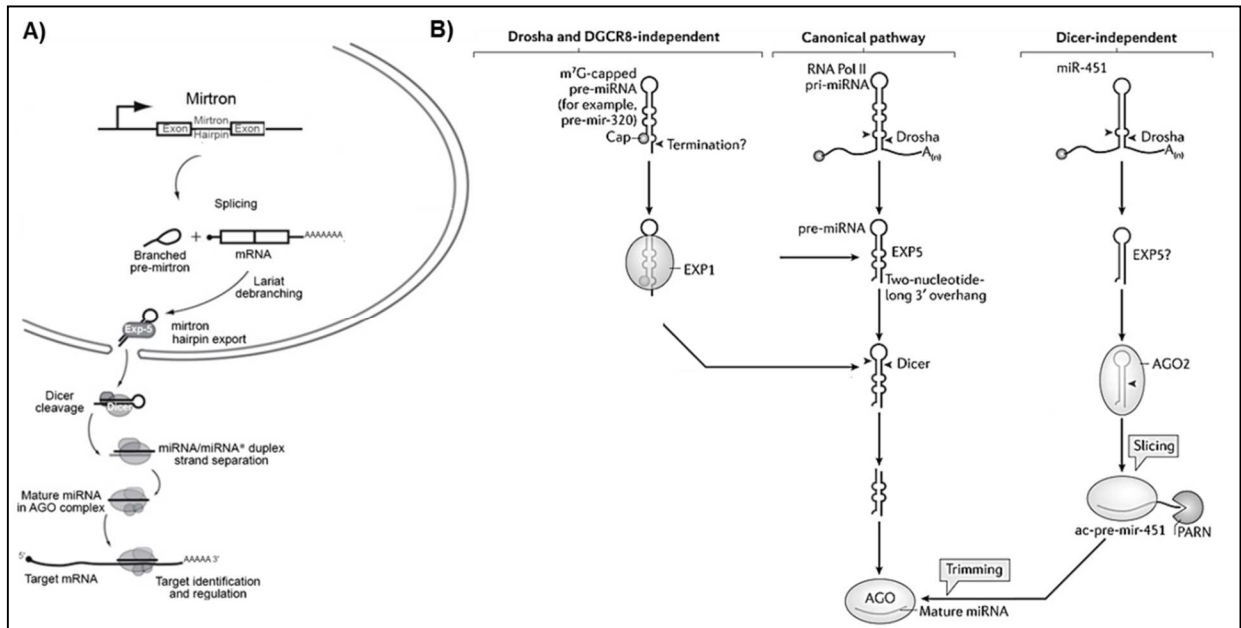


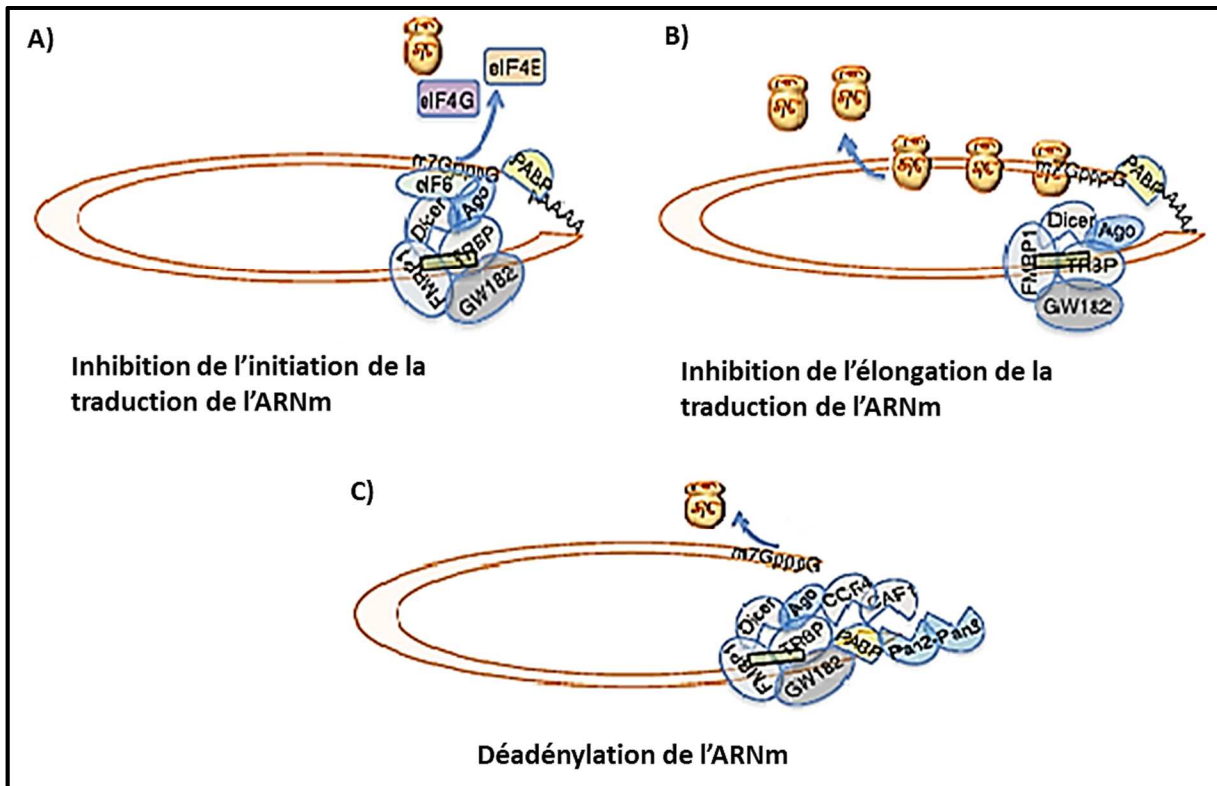
Figure 4: **Voies alternatives de biogenèse des miARNs.** A) Voie de biogenèse des mirtrons. Les mirtrons sont des courts hairpins introniques qui forment des pré-miARNs indépendamment du microprocesseur. B) Voie de biogenèse indépendante du microprocesseur et de l'exportine-5 et voie indépendante de Dicer. Panneau A) tiré et adaptées de (Liu et al., 2008). Panneau B) tiré et adapté de (Ha and Kim, 2014).



### ***I-5-1-3 Fonctions des microARNs***

Le duplexe de miARNs formé suite à la maturation par Dicer est constitué de deux brins d'ARN opposés 3p et 5p. Ce duplexe de miARNs mature est intégré dans des complexes effecteurs nommés miRNP ([Mourelatos et al., 2002](#)). Ces complexes miRNP permettront aux miARNs matures d'exercer leurs fonctions régulatrices. Les modes d'action des miARNs sont présentés dans la figure 5.

Le duplexe formé suite au clivage du pré-miARN par Dicer sera associé à la protéine Ago 2 et formera le complexe miRNP. Cette formation du complexe miRNP s'effectue par un changement de conformation nécessitant l'hydrolyse d'ATP et la présence de protéines chaperonnes ([Iwasaki et al., 2010](#)). Une fois que le duplexe est relâché par Dicer, l'extrémité la plus stable reste liée à TRBP2 et l'autre extrémité est liée par Ago. La liaison avec Ago s'effectue par le domaine PAZ de la protéine ([Cerutti and Casas-Mollano, 2006](#); [Tomari et al., 2004](#)). Suite à cette étape, le duplexe de miARNs sera dissocié puisque un brin sera gardé dans le complexe miRNP et l'autre brin sera dégradé. La sélection du brin qui sera maintenu dans le complexe dépend de la stabilité thermodynamique du duplex. Le brin dont l'extrémité 5' est la plus instable sera maintenue dans le complexe ([Kwak and Tomari, 2012](#)). Cependant la sélection ne procède pas toujours de cette façon puisque pour certains miARNs le choix du brin mature va varier selon le type cellulaire et le tissu ([Ro et al., 2007](#)). Et pour d'autres miARNs, les deux brins donneront des miARNs matures ([Ro et al., 2007](#)).



**Figure 5:** Fonctions régulatrices des miARNs et les molécules impliquées. Fonctions régulatrices des miARNs et les molécules impliquées. **A)** Inhibition de l'initiation de la traduction des ARNm. Cette inhibition se caractérise par une dissociation du complexe ribosomale 80S, par le recrutement du facteur eIF6, par le complexe RISC, ou par compétition de la protéine Ago2 avec les facteurs eIF4E ou eIF4G. **B)** Inhibition de l'élongation de la traduction de l'ARNm. L'association du complexe RISC à l'ARNm après le début de la traduction causerait un ralentissement dans le processus d'élongation et une dissociation des ribosomes (Petersen et al., 2006). **C)** Déadénylation de l'ARNm menant à sa dégradation. La déadénylation se produit par l'interaction entre Ago2 et le facteur CAF1, ce qui permet le recrutement du complexe protéique CCR4-NOT. Ce complexe abrite à la fois le récepteur CCR4 et les enzymes déadénylases CAF1. Tirée et adaptée de (Sayed and Abdellatif, 2011).

La région nommée *seed* du miARN mature constitue la région complémentaire au site de liaison sur l'ARNm cible. Cette région se situe entre les nucléotides 2 à 8 en position 5' du miARN ([Lewis et al., 2005](#)). Les nucléotides de 9 à 11 ne présentent pas de complémentarité avec l'ARNm cible, ce qui le protège du clivage par Ago2. Il a également été observé qu'un appariement pouvait se produire à l'extrémité 3', ce qui renforce l'interaction du complexe miRNP avec l'ARNm. La majorité des sites de liaison des miARNs sont situés dans le 3'UTR des ARNm cibles. D'autres sites de liaisons ont été identifiés dans le 5'UTR et dans les régions codantes des ARNm cibles. Il a été démontré que plusieurs sites de liaison peuvent être situés à proximité sur le même ARNm ([Lewis et al., 2005](#)). L'association du miRNP avec l'ARNm cible peut entraîner trois types de régulations : l'inhibition de la traduction de l'ARNm, la dégradation de l'ARNm ou l'activation de la traduction.

### **Inhibition de la traduction de l'ARNm cible**

Une complémentarité imparfaite entre le brin de miARN mature et l'ARNm cible peut entraîner une inhibition de la traduction de ce dernier. Des études proposent que l'inhibition de la traduction par les miARN soit le fruit d'une interférence avec le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction ([Humphreys et al., 2005](#); [Pillai et al., 2005](#)). Un des éléments du complexe miRNP, la famille des protéines GW182, est associée à l'inhibition de la traduction des ARNm. GW182 lie la protéine Ago2 via son domaine N-terminal, alors que le domaine C-terminal sert au recrutement de protéines effectrices requises à la répression de la traduction des ARNm cibles ([Fabian and Sonenberg, 2012](#)). GW182 antagonise la protéine PABP1 en empêchant sa liaison au complexe d'initiation eIF4F ([Zekri et al., 2009](#)). L'interaction entre eIF4F et PABP1 permet la circularisation des ARNm, ce qui est une étape nécessaire à leur traduction. Le complexe miRNP inhibe la traduction des ARNm cibles en empêchant leur circularisation ([Zekri et al., 2009](#)).

## Dégradation de l'ARNm cible

Comme pour l'inhibition de la traduction, la dégradation des ARNm requiert l'intervention de la protéine GW182. Cette protéine du complexe miRNP va permettre le recrutement de facteurs impliqués dans la déadénylation et l'enlèvement du cap de l'ARNm ([Zipprich et al., 2009](#)). Les protéines du complexe déadénylase CCR4-NOT1 (*carbon catabolite repression 4 – negative on TATA-less 1*) seront recrutées par GW182 qui va interagir avec la protéine PABP afin de permettre la déadénylation. Suite à cette étape, les enzymes DCP1 et DCP2 peuvent enlever le cap des ARNm ([Behm-Ansmant et al., 2006](#)). La déadénylation va également bloquer l'initiation de la traduction ([Behm-Ansmant et al., 2006](#)). Suite à la déadénylation et à l'enlèvement du cap, l'ARNm peut être dégradé par des exonucléases.

## Activation de la traduction

Une des actions les moins connues des miARN est l'activation de la traduction de l'ARNm cible. Cette action a été observée dans différents tissus et différentes conditions. Le miR-10a peut activer la traduction de plusieurs protéines ribosomales en se liant au 5'UTR ([Orom et al., 2008](#)). La traduction de l'ARN du virus de l'hépatite C peut être activée par le miR-122 en se liant également au 5'UTR ([Henke et al., 2008](#)). Dans un autre cas, un complexe miRNP liant FXR1 entrainera la liaison de miR-369-3p au 3'UTR du messenger de TNF- $\alpha$  et l'activation de sa traduction ([Vasudevan et al., 2007](#)). Cette action n'est observée que dans des cellules quiescentes. Dans le cas de la prolifération cellulaire, l'action observée du miR-369-3p est la répression de la traduction.

## I-5-2 Les microARNs dans le développement pulmonaire

L'action des miARNs, en régulant négativement l'expression des gènes, est nécessaire au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il est suggéré que les miARNs peuvent cibler jusqu'à 60% des gènes codants chez l'humain ([Hafner et al., 2012](#)). Une dérégulation de leur expression peut mener à plusieurs pathologies touchant différents tissus. Il a été démontré que les miARNs sont impliqués dans plusieurs pathologies respiratoires ([Brown et al., 2014](#)). L'implication des miARNs dans le développement du cancer du poumon a été largement étudiée puisque certains miARNs ont été identifiés comme des oncogènes alors que d'autres sont identifiés comme des suppresseurs de tumeurs. Ces études ont mis en évidence certains miARNs qui peuvent être des cibles thérapeutiques pour le cancer du poumon ([Brown et al., 2014](#)). Également les miARNs sont impliqués dans d'autres pathologies respiratoires telles que l'asthme ou la fibrose cystique ([Greene and Gaughan, 2013](#); [McKiernan and Greene, 2015](#)). Il a été démontré dans plusieurs modèles expérimentaux d'asthme et de fibrose cystique que les profils d'expression de certains miARNs sont dérégulés et favorisent les réponses inflammatoires caractéristiques de ces pathologies ([Oglesby et al., 2010](#)).

Les miARNs jouent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires liés au développement pulmonaire ([Johar et al., 2015](#)). Une des premières études qui ont porté sur l'implication des miARNs dans le développement pulmonaire est l'étude menée par Lu et al en 2005 démontrant que les protéines Ago1 et Ago 2, impliquées dans la biogenèse des miARNs, sont fortement exprimées au jour gestationnel 11.5 dans les régions épithéliales et mésenchymateuses pulmonaires ([Lu et al., 2005](#)). Ce qui suggère un rôle important des miARNs dans la mise en place des structures pulmonaires. Cette même équipe a démontré que l'inhibition de l'action de l'enzyme Dicer dans l'épithélium pulmonaire mène à une diminution des ramifications des voies respiratoires ([Lu et al., 2005](#)). Également, une autre étude a démontré que le profil d'expression de plusieurs miARNs varie entre les différents stades du développement pulmonaire ([Dong et al., 2010](#)).

Parmi les premiers miARNs investigués dans le développement pulmonaire on trouve le cluster miR-17-92. La surexpression in vivo de ce cluster entraine une augmentation de la prolifération et une diminution de la différenciation de l'épithélium pulmonaire ([Lu et al., 2007](#)). Par contre la délétion du cluster miR-17-92 mène à une hypoplasie pulmonaire et la létalité à la naissance ([Ventura et al., 2008](#)). Il a été également démontré que miR-17 régule négativement l'expression de la voie de signalisation de FGF10 et par conséquent altère la distribution de E-cadherin, ce qui perturbe les premières ramifications au cours du développement embryonnaire ([Carraro et al., 2009](#)).

Une autre famille de miARNs, la famille let-7, est également impliquée dans le développement pulmonaire. La famille let-7 est faiblement exprimée au cours des premiers stades du développement, ce qui permet le maintien des processus de prolifération et de ramification ([Navarro et al., 2009](#)). Let-7 cible des gènes tels que *Ras* impliqués dans les voies de prolifération ([Johnson et al., 2005](#)). Son expression dans le poumon augmente avec l'augmentation de l'âge gestationnel pour atteindre son maximum à l'âge adulte ([Bhaskaran et al., 2009](#)).

Deux autres miARNs, miR-127 et miR-135, sont fortement exprimés durant la transition entre le stade sacculaire et le stade alvéolaire ([Bhaskaran et al., 2009](#); [Liu et al., 2013](#)). Durant cette phase, leur expression se délocalise des cellules mésenchymateuses vers les cellules épithéliales, ce qui suggère un rôle crucial de ces deux miARNs dans la réorganisation cellulaire et la différenciation de l'épithélium alvéolaire.

Plusieurs études ont porté sur l'implication des miARNs dans la dysplasie bronchopulmonaire. Quelques études ont analysé le profil d'expression des miARNs dans des modèles animaux de dysplasie bronchopulmonaire. Les modèles animaux diffèrent d'une étude à une autre avec des traitements

d'hyperoxie variant de 60% à 95% ([Bhaskaran et al., 2012](#); [Dong et al., 2012](#); [Zhang et al., 2011](#)). Ces différences dans les conditions d'hyperoxie mènent à des profils d'expression différents. Parmi les miARNs dont les résultats sont reproductibles entre les différents modèles on trouve miR-21 et let-7f qui sont surexprimés sous l'effet de l'hyperoxie ([Bhaskaran et al., 2012](#); [Dong et al., 2012](#); [Zhang et al., 2011](#)). Une autre étude récente a montré que la surexpression du miR-489 mène à l'inhibition de la septation alvéolaire et qu'un antagoniste au miR-489 pourrait être une cible thérapeutique pour la BPD ([Olave et al., 2015](#)).

La différence sexuelle dans l'expression des miARNs au cours du développement pulmonaire a également été étudiée. Cette étude a montré que plusieurs miARNs présentent des profils d'expression différents entre mâles et femelles entre les jours gestationnels 15 et 18. Cette étude a identifié 25 miARNs présentant une différence sexuelle, suggérant que les hormones sexuelles peuvent jouer un rôle sur l'expression des miARNs au cours du développement pulmonaire ([Mujahid et al., 2013a](#)).

### **I-5-3 Régulation des miARNs par les stéroïdes**

Les gènes des miARNs sont localisés dans les régions intergéniques et peuvent être régulés par les mêmes mécanismes régulant les gènes codants. La régulation des miARNs par les stéroïdes a été étudiée dans plusieurs pathologies, tels que le cancer de la prostate où les androgènes sont fortement exprimés, des maladies immunitaires impliquant les glucocorticoïdes ou encore le cancer du sein estrogéno-dépendant.

### ***I-5-3-1 Régulation des miARNs par le récepteur des androgènes***

Une première étude a montré que le traitement du foie de souris femelles à la testostérone induisait une surexpression de 6 miARNs ([Delic et al., 2010](#)). Un de ces miARNs contient, dans son promoteur, un élément de réponse aux androgènes (ARE). L'action de la testostérone sur les miARNs peut affecter la synthèse d'autres stéroïdes. Notamment, l'action de la testostérone surexprime le miR-22 qui a comme cible le récepteur aux estrogènes (ER) et l'enzyme aromatase. La testostérone induirait alors une baisse d'expression d'ER et de l'aromatase via le miR-22 ([Delic et al., 2010](#)).

Le profil d'expression des miARNs dans des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques dont la croissance peut être dépendante ou indépendante des androgènes a montré une faible expression de deux miARNs, miR-146a et miR-146b, dans les lignées cellulaires indépendantes des androgènes ([Lin et al., 2008](#)). Il a été démontré qu'une surexpression du miR-146a mène à une inhibition de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaire. Son absence dans les cellules cancéreuses indépendantes des androgènes contribue à la nature agressive de ces cellules cancéreuses.

Il a été démontré que AR peut se lier au promoteur de l'oncomir miR-21 afin d'induire son expression. La surexpression du miR-21 est suffisante pour transformer des cellules cancéreuses prostatiques dépendantes des androgènes, en cellules indépendantes. miR-21 favorise la prolifération et la migration cellulaire et inhibe l'apoptose ([Ribas et al., 2009](#)).

AR peut également se lier directement au promoteur du miR-125b et induire son expression. L'expression du miR-125b est élevée dans des lignées cellulaires indépendantes des androgènes. Cet oncomir favorise la prolifération cellulaire et



inhibe l'apoptose en ciblant directement des gènes pro-apoptotiques ([Shi et al., 2007](#)).

En plus de réguler directement l'expression des ARNm des gènes cibles, certains miARNs peuvent avoir un impact plus général sur l'expression génique en affectant la régulation de gènes impliqués dans la régulation épigénétique. Notamment, le miR-101 est surexprimé sous l'effet des androgènes et cible une histone méthyltransférase, Ezh2. La surexpression de miR-101 dans les cellules de la prostate entraîne une réduction d'Ezh2, de la méthylation des histones et, par conséquent, de la capacité invasive ([Cao et al., 2010](#)).

#### ***I-5-3-2 Régulation des miARNs par le récepteur aux glucocorticoïdes (GR)***

L'activation transcriptionnelle de GR peut induire l'expression des miARN introniques transcrits en même temps avec des gènes activés par GR. Rainer et al. ont corrélé des niveaux de miARNs avec les données d'expression de leurs gènes hôtes dans des lignées cellulaires et des échantillons cliniques d'enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique subissant une monothérapie systémique de glucocorticoïdes ([Rainer et al., 2009](#)). Cinq miARNs ont été significativement régulés par la thérapie de glucocorticoïdes. Le cluster miR-15/16, dont l'expression mène à un arrêt du cycle cellulaire, est régulé positivement par les glucocorticoïdes chez les enfants atteints de leucémie et dans les lignées cellulaires. Cet effet est compatible avec l'effet apoptotique connu de GC dans les lymphoblastes immatures. La surexpression de miR-15b/16 imite une sensibilité accrue aux glucocorticoïdes dans des lignées cellulaires de la leucémie. Par contre, la suppression de l'expression du miR-15b/16 diminue la réponse aux glucocorticoïdes in vitro, suggérant également que la régulation des miARNs est un élément essentiel de la signalisation de GC ([Rainer et al., 2009](#)).

### ***I-5-3-3 Régulation des molécules impliquées dans la biogenèse des miARNs par les récepteurs d'hormones stéroïdiennes***

Plusieurs éléments impliqués dans la biogenèse des miARNs peuvent être régulés par certains récepteurs d'hormones stéroïdiennes notamment les récepteurs aux estrogènes. Il a été démontré dans le cas de cancers ovariens qu'une faible expression du récepteur ER $\alpha$  mène à de faibles concentrations de l'enzyme Dicer et de son cofacteur TRBP, ce qui entraîne de faibles concentrations de miARNs. Par contre l'expression d'Ago1 et d'Ago2 augmente avec la diminution de l'expression d'Er $\alpha$ . Le complexe RISC est également affecté suite à une faible expression d'Er $\alpha$ , ce qui diminue l'efficacité du miRNA à réguler son ARNm cible. Il a également été démontré que les niveaux d'expression de l'exportine 5 augmentent avec l'augmentation des niveaux de la progestérone et de l'estradiol. Er $\alpha$  peut interférer avec le microprocesseur DROSHA, ce qui empêche ce dernier à former le pré-miRNA à partir du miRNA ([Cheng et al., 2009](#); [Faggad et al., 2010](#); [Yamagata et al., 2009](#)).

## **I-6 Projets d'études**

### **I-6-1 Présentation générale**

L'implication des stéroïdes dans le développement pulmonaire est la thématique de recherche principale dans notre laboratoire. Les études antérieures ont montré que le poumon foetal peut être considéré comme une glande intracrine/endocrine exprimant des enzymes de synthèse stéroïdiennes et produisant des hormones stéroïdiennes. Les recherches antérieures ont été menées principalement sur les androgènes et les glucocorticoïdes pour leurs rôles importants dans le développement pulmonaire. Les androgènes participent au développement normal du poumon mais ils sont aussi les responsables du retard de maturation observé chez les bébés prématurés de sexe masculin comparativement aux filles. Quant aux glucocorticoïdes, ils participent à la

maturation des cellules épithéliales de type II responsables de la synthèse du surfactant pulmonaire. Il a été démontré que les enzymes de synthèse des glucocorticoïdes sont exprimés dans le poumon foetal murin. Ces résultats ont inspiré le projet de recherche présenté dans le chapitre IV de cette thèse, portant sur l'expression d'enzymes de synthèse des glucocorticoïdes dans le poumon foetal humain. Également, il a été démontré que les androgènes modulent l'expression de plusieurs gènes au cours du développement pulmonaire. Les projets de recherches présentés dans les chapitres III et IV ont découlé de ces résultats. Ces projets s'intéressent à l'expression des miARNs dans le poumon foetal et à l'effet des androgènes sur leurs expressions.

## **I-6-2 Hypothèses**

Les hypothèses principales ayant fait l'objet des projets de recherche présentés dans cette thèse de doctorat sont les suivantes :

- 1) **Les androgènes régulent l'expression des miARNs au cours du développement pulmonaire tardif chez la souris.** L'action négative des androgènes sur la maturation tardive du poumon pourrait passer par l'action des miARNs en régulant négativement l'expression de gènes importants pour le développement pulmonaire. Les chapitres II et III étudient cette hypothèse.
- 2) **Le poumon humain en développement exprime l'enzyme 21-hydroxylase, enzyme clé dans la synthèse des glucocorticoïdes.** L'enzyme 21-hydroxylase métabolise la progestérone en désoxycorticostérone. Ce dernier est un glucocorticoïde actif capable de lier et activer le récepteur GR. Son expression dans le poumon foetal humain suggère une synthèse in situ de glucocorticoïdes actifs. Cette hypothèse est investiguée dans le chapitre IV.

### I-6-3 Objectifs

Les objectifs spécifiques de mes travaux de doctorat sont les suivants :

- 1) Identifier par trois logiciels différents les meilleurs candidats de gènes de normalisation afin de quantifier par PCR quantitative l'expression des miARNs dans le poumon fœtal murin à partir du stade pseudoglandulaire au stade alvéolaire du développement et chez les deux sexes. Cette étude est primordiale pour aborder le chapitre suivant. Cette étude est présentée au chapitre II.
- 2) Identifier les miARNs dont l'expression est modulée par les androgènes dans le poumon fœtal murin aux jours gestationnels 17 et 18 (période de la montée de la synthèse du surfactant) par une approche de microarray. Également, identifier leurs gènes cibles potentiels pouvant être impliqués dans la maturation pulmonaire et/ou la différenciation cellulaire, en utilisant un programme bio-informatique. Cette étude est présentée au chapitre III.
- 3) Caractériser l'expression de l'enzyme 21-hydroxylase dans le poumon fœtal humain à différents âges gestationnels en utilisant différentes approches expérimentales complémentaires, notamment par PCR quantitatif, par hybridation *in situ* et par immunobuvardage. Ces études sont présentées au chapitre IV.

## **Chapitre II : Identification des gènes de normalisation pour la quantification des miARNs dans le poumon en développement chez la souris**

Article publié dans le journal Plos One ([Bouhaddioui et al., 2014](#)) sous le titre:

« *Identification of the most stable endogenous control genes for microRNA quantification in the developing mouse lung* »

## Résumé en français de l'étude

Les microARNs (miARNs) sont de petits ARNs endogènes non-codants agissant comme des régulateurs négatifs. Les miARNs sont impliqués dans le développement du poumon et les maladies respiratoires. Leur quantification par qPCR est directement influencée par la stabilité des gènes de normalisation, lesquels peuvent être affectés par les conditions expérimentales. Le poumon en développement est un tissu dynamique qui subit plusieurs changements et un gène de normalisation montrant une stabilité à un jour précis du développement peut être modulé en fonction du temps. De plus, la différence sexuelle doit être prise en considération car certains événements au cours du développement sont modulés selon le sexe. Dans cette étude, nous avons comparé, chez les deux sexes, la stabilité de cinq gènes de normalisation dans des poumons fœtaux à partir du stade pseudoglandulaire jusqu'au stade alvéolaire ainsi que dans des poumons adultes. L'expression de *sno135*, *sno142*, *sno202*, *sno234* et *sno251* a été étudiée par qPCR dans des échantillons pulmonaires mâles et femelles recueillis à sept temps de gestation entre GD 15,5 et PN 30. Les Cq du gène *sno251* ont montré la plus forte variation selon les différents stades de développement, alors que *sno234* était le gène le plus stable. La stabilité d'expression des gènes a été étudiée par geNorm, NormFinder et BestKeeper. Nos données montrent que le classement des gènes en fonction de la stabilité d'expression change en fonction du stade de développement et selon le sexe. *sno135/sno234* et *sno142/sno234* ont été proposés comme meilleurs combinaisons de gènes de normalisation lorsque tous les stades sont considérés en combinant les deux sexes. Les meilleures combinaisons des gènes de normalisation sont présentées spécifiquement pour chaque stade du développement. La normalisation des niveaux d'ARN de *let-7a* avec les paires de gènes de normalisation proposées par geNorm et NormFinder a donné des résultats similaires, tandis que l'utilisation de gènes moins stables introduit une différence statistiquement significative à PN 0. En conclusion, des variations de la stabilité d'expression des gènes de normalisation sont observées au cours du

développement pulmonaire et selon le sexe. L'utilisation de gènes de normalisation stables est essentielle pour étudier le développement pulmonaire.

# Identification of most stable endogenous control genes for microRNA quantification in the developing mouse lung

Wafae Bouhadioui<sup>1,3</sup>, Pierre R. Provost<sup>1,2,3</sup> and Yves Tremblay<sup>\*1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Reproduction, Mother and Youth Health, Centre de recherche CHU de Québec, Québec, QC, Canada

<sup>2</sup> Department of Obstetrics/Gynecology & Reproduction, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

<sup>3</sup>Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR), Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada

## \*Corresponding author/to whom reprint requests should be addressed:

Dr. Yves Tremblay

Department of Obstetrics/Gynecology & Reproduction

Reproduction, Mother and Youth Health, Centre de recherche du CHU de Québec

Director CIHR-IGH-NET Gender Differences and Premature Infants

Director FRQS-Respiratory Health Network

2705 Laurier Boulevard, Rm T-3-67, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

Phone : 1-418-525-4444 #46158; Fax: 1-418-654-2783

E-mail: [yves.tremblay@crchudequebec.ulaval.ca](mailto:yves.tremblay@crchudequebec.ulaval.ca)

**Keywords:** miRNA, normalization, control genes, sex difference, lung development, snoRNA, respiratory, quantification, quantitative real time PCR.



## Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small non coding RNAs acting as negative regulators. miRNA are involved in lung development and pulmonary diseases. Measurement of their levels by qPCR is directly influenced by the stability of normalization gene(s), which can be affected by the experimental conditions. The developing lung is a changing tissue and one normalization gene showing stability on one developmental day may be modulated over time. Moreover, some developmental events are affected by sex, which also has to be considered. In this study, we compared stability of five putative control genes in the lung between sexes from the pseudoglandular to the alveolar stages and in adult lungs. Expression of *sno135*, *sno142*, *sno202*, *sno234*, and *sno251* was studied by qPCR in male and female lung samples collected at seven time points from GD 15.5 to PN 30. Cq values of *sno251* showed the highest variation across the different developmental stages, while *sno234* was the most stable gene. Gene expression stability was studied by geNorm, NormFinder and BestKeeper. Our data showed that ranking of genes based on expression stability changed according to developmental time and sex. *sno135/sno234* and *sno142/sno234* were proposed as best combinations of normalization genes when both sexes and all the studied developmental stages are considered. Normalization of let7-a RNA levels with different pairs of control genes proposed by geNorm and NormFinder gave similar data, while the use of less stable genes introduced a statistically significant difference on PN 0. In conclusion, variations in stability of normalization gene expression are observed over time and according to sex during lung development. Best pairs of normalization genes are presented for specific developmental stages, and for the period extending from the pseudoglandular to the alveolar stages. The use of normalization genes selected for their expression stability is essential in lung development studies.

## II-1 Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small non coding RNAs of ~ 22 nucleotides ([He and Hannon, 2004](#)). They are endogenous regulatory molecules that negatively regulates gene expression ([He and Hannon, 2004](#)). The two first discovered miRNAs were reported in 1993 (Lin 4) and 2000 (let-7) ([Lee et al., 1993](#); [Reinhart et al., 2000](#)). This class of molecules are involved in different physiological and pathological processes. miRNAs are highly conserved across plants, micro-organisms and animals ([Grosshans and Slack, 2002](#)). The miRBase (online database of miRNA sequences ([Kozomara and Griffiths-Jones, 2011](#))) contains so far 2578 mature miRNA sequences and 1872 precursor human miRNA sequences, while 1908 and 1186 mature and precursor miRNA sequences are reported respectively for the mouse. It was shown that over 60% of human protein-coding genes are conserved targets of miRNAs ([Friedman et al., 2009](#)). The lung miRNA expression profile is highly conserved among mammalian species ([Williams et al., 2007a](#); [Williams et al., 2007b](#)). miRNAs are involved in homeostasis and lung development ([Lu et al., 2007](#)), inflammation and viral infections ([Banerjee et al., 2010](#); [Lecellier et al., 2005](#)), and many pulmonary diseases such as cancer ([Yanaihara et al., 2006](#)) and chronic obstructive pulmonary disease ([Sato et al., 2010](#)). Knowledge on the role of miRNAs in lung development is still limited and based mainly on data from animal models.

Among quantification techniques used to study miRNAs, quantitative real time PCR (qPCR) is one of the most specific, sensitive and fast. Due to the small size of miRNA, a new qPCR method was developed to provide better specificity and sensitivity. This method includes two steps: stem-loop reverse transcription (RT) and qPCR ([Chen et al., 2005](#)).

In the first step, a stem-loop RT primer is hybridized to a miRNA molecule and pulsed RT is initiated. In the second step, the RT product is amplified with a specific forward primer and a universal reverse primer ([Chen et al., 2005](#); [Varkonyi-Gasic and Hellens, 2010](#)). RT and qPCR efficiencies are subjected to

variation due to several factors including the amount and quality of starting materials. To take into account these variations, normalization is performed using endogenous control genes. It has been reported that it is better to normalize target RNA levels with control genes belonging to the same RNA class ([Vandesompele et al., 2002](#)). Therefore, for normalization of miRNA levels, the endogenous control genes would belong to the small non-coding RNA family (ncRNA), such as snRNA (small nuclear RNA) and snoRNA (small nucleolar RNA). Several candidate snRNAs and snoRNAs were tested across different tissues and experimental conditions to determine suitable endogenous controls ([Davoren et al., 2008](#); [Peltier and Latham, 2008](#)). However, no such analysis has yet been performed in the changing developing mouse lung.

snoRNAs are constitutively and abundantly expressed molecules found within the nucleolus where they are involved in chemical modification of various classes of RNAs ([Cavaille and Bachellerie, 1998](#); [Finnegan and Matzke, 2003](#); [Kiss, 2002](#)). For this study, we selected five snoRNAs that were already tested across different adult mouse tissues for stability ([Wong, 2010](#)) We already demonstrated that the expression profile of many genes varies according to sex and developmental stage ([Simard et al., 2006](#)). Expression of several miRNAs was also shown to vary according to sex and developmental age in the developing lung ([Mujahid et al., 2013a](#)).

*Let-7* is highly conserved across animal species ([Pasquinelli et al., 2000](#)). Some studies report the important role of *Let-7* in the development of *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, and some mammals ([Abbott et al., 2005](#); [Bashirullah et al., 2003](#); [Sempere et al., 2004](#); [Sokol et al., 2008](#)). *Let-7* genes are expressed in the mouse developing lung ([Dong et al., 2010](#)) and are among the highly expressed miRNAs in the adult mouse lung ([Polikepahad et al., 2010](#)). They were shown to exert anti- and pro-inflammatory actions in respiratory diseases ([He et al., 2009](#); [Polikepahad et al., 2010](#)), and to act as tumor suppressor in lung cancer ([Boyerinas et al., 2010](#); [Shin and Brusselle, 2013](#); [Trang et al., 2010](#)).

In order to find endogenous control genes to study miRNA expression in the developing mouse lung of both sexes, expression stability of five putative snoRNA endogenous control genes was studied. The results are presented here. Calculation was performed separately for each developmental stage, and with all the time points together. The importance to select the appropriate combination of control genes is shown by qPCR relative quantification of *Let-7a* expression.

## **II-2 Materials and Methods**

### **II-2-1 Animals and housing**

Protocols were approved by the Comité de protection des animaux du CHU de Québec (protocol no. 2011-053). All animals were kept under a 12 h light/dark cycle and received water and feed ad libitum. Females and males Balb/c mice (Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, Canada) were mated during a one hour window, which corresponded to gestational day (GD) 0.0. For animals sacrificed after birth, the beginning of postnatal day (PN) 0 corresponded to parturition. Pregnant females were sacrificed by exposure to CO<sub>2</sub> and pups by decapitation following hypothermia-induced anesthesia (PN 0 to PN 5), or by intra-peritoneal injection of Euthanyl (PN 5 to PN 30). Fetal/neonatal lungs and hind legs were collected and snap frozen.

### **II-2-2 Fetal sex determination**

Fetal sex was determined by PCR amplification of the male-specific *Sry* gene (GenBank no. X67204) from fetal legs. DNA was extracted with Extracta™ DNA Prep for PCR – Tissue (Quanta BioSciences) as described by the manufacturer. PCR amplification was performed using AccuStart™ PCR SuperMix Kit (Quanta BioSciences) with 0.04 nM of each *Sry* primer (forward: 5'TATGGTGTGGTC

CCGTGGTG-3'; reverse: 5'-ATGTGATGGCATGTGGGTTCC-3'), resulting in an amplicon of 282 nucleotides. The following PCR conditions were used: 94°C for 5 min and 72°C for 10 min followed by 34 cycles of 94°C for 1 min, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min. Final extension was done at 72°C for 10 min. Agarose gel electrophoresis was used for amplicon visualization. Sex of neonates was determined by examination of the ano-genital distance and gonadal morphology.

### **II-2-3 RNA isolation**

For each litter, the whole lungs of fetal /neonatal mice were pooled by sex prior to homogenization. Three litters were pooled to create each biological replicate (Table 1). Total RNA was extracted using Tri-reagent, a mixture of phenol and guanidine thiocyanate in a monophasic solution (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), then purified on a CsCl gradient as previously described ([Provost et al., 2004](#)). RNA integrity was verified using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, U.S.A.). RIN values were between 7.5 and 10 for all the samples but two, which gave values of 6.3 and 6.4. RNA purity was determined using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). For all the samples, the OD260/280 ratio was over 1.95.

### **II-2-4 Reverse transcription and quantitative PCR**

RT and qPCR were performed as described by Varkonyi-Gasic and Hellens ([Varkonyi-Gasic and Hellens, 2010](#)). This method combines the advantages of using stem-loop RT primers specific to each analyzed miRNA and a pulsed RT reaction, two parameters that increase the specificity and sensitivity of detection. Briefly, 300 ng of each RNA template were denatured and mixed with 62.5 µM of each dNTP and 50 nM of the stem-loop primer at 65°C for 5 min, and then transferred on ice. First-strand buffer (SuperScript II kit, Life Technologies), 4 units of Protector RNase Inhibitor (Promega) and 50 units of SuperScript II RT (Life Technologies) were added to the mixture for a total reaction volume of 20 µl.

Samples were incubated for 30 min at 16°C, followed by pulsed RT of 60 cycles at 30°C for 30 sec, 42°C for 30 sec and 50°C for 1 sec. Reverse transcriptase was then inactivated for 5 min at 85°C. No-template control and no-reverse transcriptase control were performed and no amplicon was detected. qPCR was performed using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics) and a Light Cycler device (Roche Diagnostics). Reactions were performed according to the manufacturer's instructions with 0.5 µM of each primer (final concentration) and 30 ng of total RNA input in a final volume of 20 µl. Samples were incubated at 95°C for 5 min, followed by 43 cycles of 95°C for 5 sec and 60°C for 10 sec. At the end of each run, samples were heated to 95°C with a temperature transition rate of 0.2°C/sec to construct dissociation curves. Amplicons from all the amplified genes were sequenced showing the specificity of PCR reactions. Primers used in this study are listed in Table 2. A technical duplicate was performed for each biological replicate.

## **II-2-5 Housekeeping gene expression stability and data analysis**

Stability of housekeeping genes was assessed with three different programs: geNorm, NormFinder, and BestKeeper. geNorm (v.3.4) calculates the gene expression stability measure  $M$  for a control gene as the average pairwise variation  $V$  for that gene with all other studied control genes ([Vandesompele et al., 2002](#)). Stepwise exclusion of the gene with the highest  $M$  value allows ranking of the tested genes according to their expression stability ([Vandesompele et al., 2002](#)). The geNorm applet calculates also one gene expression normalization factor for each tissue sample based on the geometric mean of the selected reference genes ([Vandesompele et al., 2002](#)). NormFinder (v.20) is an applet identifying the optimal normalisation gene(s) among a set of candidate genes. It uses an ANOVA-based model to estimate intra- and inter-group variations, and it ranks the set of candidate normalization genes conforming to their expression stability ([Andersen et al., 2004](#)). Bestkeeper (v1.0) determine the expression stability of control genes from the Cq values by calculating standard deviation, percentage of covariance and

coefficient of correlation. A BestKeeper Index is calculated for each sample as the geometric mean of Cq values of control genes, and the correlation between each candidate gene and the index is calculated to obtain the coefficient of correlation ([Pfaffl et al., 2004](#)).

For relative quantification of Let-7a RNA levels, the standard curves required for the external standard normalization method were prepared as previously described ([Simard et al., 2007](#)). Normalization factors were calculated with geNorm as described above.

## **II-2-6 Statistics**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A paired Student t-test was used to compare the expression values of *Let7-a* between sexes. A p-value  $\leq 0.05$  was considered to be significant.

## **II-3 Results and Discussion**

### **II-3-1 Expression stability of putative endogenous control genes**

Selection of inappropriate control genes can introduce pseudo-variations or hide real biological variations. Because the developing lung is changing over time, quantification of miRNA expression requires careful selection of endogenous control genes according to the studied period of development. Because some developmental events are delayed in male lungs compared with female lungs ([Bresson et al., 2010](#); [Nielsen, 1985](#); [Nielsen and Torday, 1981](#); [Provost et al., 2004](#); [Seaborn et al., 2010](#)), the sex has also to be considered. The selected samples (Table 1) covered four developmental stages extending from the end of the pseudoglandular stage (gestation day (GD) 15) to the end of the alveolar stage

(postnatal day (PN) 30). This developmental period includes lung maturation and alveolarization, which are respectively related to respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia, two major diseases frequently observed in cases of preterm birth. One pool per sex per litter and three litters per time point were analyzed. Because the use of multiple control genes is highly recommended for normalization of RT-qPCR data ([Vandesompele et al., 2002](#)), five putative endogenous snoRNA control genes were selected (Table 2). These snoRNAs were subjected to a non-exhaustive expression study with adult mouse tissues by Wong et al. ([Wong, 2010](#)) and *sno202* was proposed as normalization gene because it showed the highest abundance and least variability across the 12 tested tissues.

In this study, RT-qPCR was performed to quantify expression of *sno135*, *sno142*, *sno202*, *sno234*, and *sno251*. The results were expressed as mean Cq (quantification cycle) (Figs. 1 and S1), which is the standard name for Ct or Cp according to the Real-time PCR Data Markup Language (RDML) guidelines ([Lefever et al., 2009](#)). The gene to gene differences between the Cq values were quite similar for all the tested developmental time points (Fig. S1). The most expressed gene was *sno202* for both sexes at all the tested developmental stages, which is consistent with the study of Wong *et al.* performed on adult mouse tissues, including the lung ([Wong, 2010](#)). *sno251* showed the higher variation across the different developmental stages, while Cq values of *sno234* were the most stable from stage to stage (Fig. 6).

Several softwares were developed to analyze the expression stability of reference genes, the most largely used being geNorm, NormFinder and BestKeeper. They are used here. geNorm calculates the stability value *M* based on the arithmetic mean of all pairwise variations to determine the stability of control genes; the lower the *M* value, the higher the stability ([Vandesompele et al., 2002](#)). NormFinder estimates the overall expression variation of the candidate normalization genes, as well as the intra-group and the inter-group variations ([Andersen et al., 2004](#)). Again, decreasing stability values indicate increasing gene



expression stability. The two programs determine also the best pair from a panel of control genes. geNorm proceeds by stepwise exclusion of the gene with the highest  $M$  value, and a new  $M$  value is calculated for the remaining genes, ending with a combination of the two most stable genes. The ranking of genes vary during this process. geNorm also provides the optimal number of reference genes required for normalization. NormFinder selects two best genes with minimal combined inter- and intra- group expression variation. Generally, the results from both softwares are slightly different but consistent. BestKeeper was used to generate SD values: the lower the SD value, the higher the gene stability.

We assessed the stability of putative control genes in the developing lung at specific developmental stages to determine the most stable genes based on stability values calculated by geNorm, NormFinder and BestKeeper. The stability values were determined for each developmental stage separately for each sex (Table 3) and with both sexes combined (Table 4). Our data demonstrate that the relative gene stability may vary throughout the developmental period. For example, in males, *sno142* ranked first during the sacular stage while it was the least stable gene during the canalicular stage with geNorm and NormFinder (Table 3). *sno234* was the least stable gene during the sacular stage and the most stable gene during the pseudoglandular and the alveolar stages with both geNorm and NormFinder (Table 4). In addition, *sno251* was the least stable gene during the pseudoglandular and the canalicular stages with the three calculation methods, while it was the second more stable gene during the alveolar stage with geNorm and NormFinder (Table 4). These observations are compatible with the fact that the developing lung is changing across developmental time.

Ranking of genes according to expression stability can also vary between sexes. For example, during the canalicular stage, *sno142* was the most stable gene in females and the least stable gene in males by geNorm and NormFinder (Table 3). During the sacular stage, the same situation occurred with *sno251*. In contrast, BestKeeper did not show these sex differences. However, for *sno234*, the three

calculation methods showed a sex difference in ranking during the sacular stage (Table 3) with less stability in females. The SD values for BestKeeper were 1.226 for females and 0.433 for males. In adult lungs, the most stable gene by geNorm and NormFinder was *sno234* in females but not in males where it was the least stable gene (Table 3). Taken together, our data show that gestation time and sex may both influence gene stability and ranking.

The optimal number of reference genes for normalization was calculated by geNorm for each developmental stage for both sexes combined (Fig. 7). The optimal number of genes varied from 2 to 4 according to the period of gestation studied. The optimal number of genes is recommended for the study of small expression differences. We have compared the use of the best pair of reference genes vs the optimal number of reference genes as proposed by geNorm for the analysis of the sex difference in *Let7a* expression during the sacular and the alveolar stages. No statistically significant sex difference was obtained at all (sacular stage:  $P = 0.2188$  and  $0.2857$  for 4 and 2 reference genes, respectively; alveolar stage:  $P = 0.8203$  and  $0.9102$  for 3 and 2 genes, respectively). Based on our data and on previous reports ([Chang et al., 2010](#); [Davoren et al., 2008](#); [Kheirelseid et al., 2010](#); [Lardizabal et al., 2012](#); [Zhu et al., 2014](#)), we propose using the best pairs of reference genes.

Best pair combination of normalization genes were calculated using samples of both sexes for each developmental stage (Table 4). In fact, the two more stable genes were not necessarily the best pair combination, which can be determined by geNorm and NormFinder based on the variability of a pair of genes instead of one gene. The pairs of genes proposed by geNorm and NormFinder were identical only for the adult lungs (*sno135/sno142*), which were in fact the most homogenous materials, in contrast to developing lungs which were not necessarily perfectly synchronized. However, at least one proposed gene of each pair was identical between the two methods for each developmental stage and all the proposed pairs had acceptable stability values. By geNorm, the best pair combinations were

*sno142/sno234* for the pseudoglandular stage, *sno135/sno234* for the canalicular and the alveolar stages, and *sno135/sno142* for the saccular stage. In NormFinder, *sno135/sno234*, *sno135/sno142*, *sno142/sno251*, and *sno234/sno251* were the best gene combinations for the pseudoglandular, canalicular, saccular and the alveolar stages, respectively.

We have also assessed the stability of control genes with all developmental stages and both sexes combined to determine which pairs of control genes were the most stable across lung development (Table 4). In geNorm, the best pair combination was *sno135/sno234*, while *sno142/sno234* was proposed by NormFinder.

As shown above, the five genes were not systematically ranked in the same order by geNorm, NormFinder and BestKeeper. Such differences between the three methods are expected and were already reported ([Huang et al., 2014](#); [Jiang et al., 2014](#); [Matouskova et al., 2014](#)) because the three algorithms use different mathematical models. In addition we observed that geNorm and NormFinder generated more similar ranking compared with BestKeeper (Table 3 and 4). Such a phenomenon was also reported by Jiang et al. ([Jiang et al., 2014](#)). This can be explained by the fact that, in contrast to geNorm and NormFinder, BestKeeper estimates the variation of each single gene independently. Nevertheless, some differences in gene ranking were also observed between geNorm and NormFinder (Table 3 and 4), as already reported ([Caradec et al., 2010](#); [Huang et al., 2014](#); [Jiang et al., 2014](#); [Matouskova et al., 2014](#)).

### **II-3-2 Effect of endogenous control genes on the measure of relative Let7-a expression level**

To determine the effect of the selection of normalization genes on quantification of miRNA expression, we quantified Let-7a RNA levels using different pairs of

control genes. First, we selected the best pairs of genes sorted by geNorm and NormFinder for the canalicular stage and compared the results with those obtained with another pair of genes. The magnitude of the sex difference in *let7-a* expression levels evaluated with the two proposed pairs of genes was similar (3.8 x vs 4.8 x), whereas the data normalized with the least stable pair of genes showed higher sex differences (10.6 x) (Fig. 8). Second, we reproduced the same experiment but using samples from GD 18.0 and PN 0 of the sacular stage separately. No statistically significant sex difference in *let7-a* expression levels was observed on GD 18.0 with either the best pairs of normalization genes calculated with all the samples of the sacular stage by geNorm (*sno135/sno142*) and NormFinder (*sno142/sno251*), or the least stable control genes (*sno234/sno202*) (Fig. 9). However, for males on GD 18.0, a higher variability between biological replicates was observed with the best control genes selected by geNorm compared with those selected by NormFinder. For an unknown reason, such a higher variability was not observed for all the experimental conditions normalized with this pair of control genes (*sno135/sno142*). With samples from PN 0, no sex difference was observed in *let7-a* expression levels using the best pair of control genes from the two calculation methods, while a statistically significant sex difference ( $p < 0.02$ ) was observed with the other pair. Therefore, the use of the two calculation methods led to similar conclusions, in contrast to the use of the less stable pair of normalization genes. We also used the most stable pair of genes calculated by geNorm with data from the entire studied developmental window (*sno135/sno234*). When normalized with these control genes, the *let7-a* expression data showed no statistically significant sex difference, which is the same conclusion as with the best stable control genes calculated with geNorm and NormFinder using only the samples from the sacular stage (Fig. 9 D). The fact that the developing lung is changing implies that normalization genes should be selected within the analyzed time window. The use of control genes selected from multi-stage sampling would be reserved for studies extending over multiple developmental stages. Taken together, our data demonstrate the importance of choosing the most stable pair of endogenous control genes to adequately represent the actual biological situation.

## **II-4 Conclusion**

Recent studies quantifying miRNAs by qPCR in the developing lung used normalization genes known to be stable in various adult tissues ([Bhaskaran et al., 2012](#); [Zhang et al., 2011](#); [Zhang et al., 2012](#)). To our knowledge no study has focused on analyzing the expression stability of control genes in the lung by sex and over developmental time. Our study analyzes the stability expression of five endogenous control genes through lung development and by sex. Our data demonstrate that ranking of genes according to expression stability is influenced by sex and developmental age when geNorm, NormFinder or BestKeeper is used. We present for the first time pairs of control genes for specific developmental stages as well as for the entire period extending from the pseudoglandular to the alveolar stages of lung development, which corresponds to the most studied period. These findings will be helpful for studies of miRNA involvement in lung development and neonatal diseases related to preterm birth.

## **II-5 Acknowledgments**

We thank Sarah Tremblay and Catherine Gilbert for help in mice mating. We thank Dr Manon Richard for critical reading of the manuscript. We acknowledge CHIR-Quebec Training Network in Perinatal Research and CIHR Quebec Respiratory Health Training Program for studentships to WB.

## II-6 Figure Legends

**Figure 6: Expression levels of putative housekeeping genes in the mouse lung at different developmental stages and in the adult lung.** Cq (mean  $\pm$  SEM) obtained by qPCR are presented for the five putative control genes for the indicated developmental stages and for adult lungs. Pools of male and female lungs were used (see Table 1 for details).

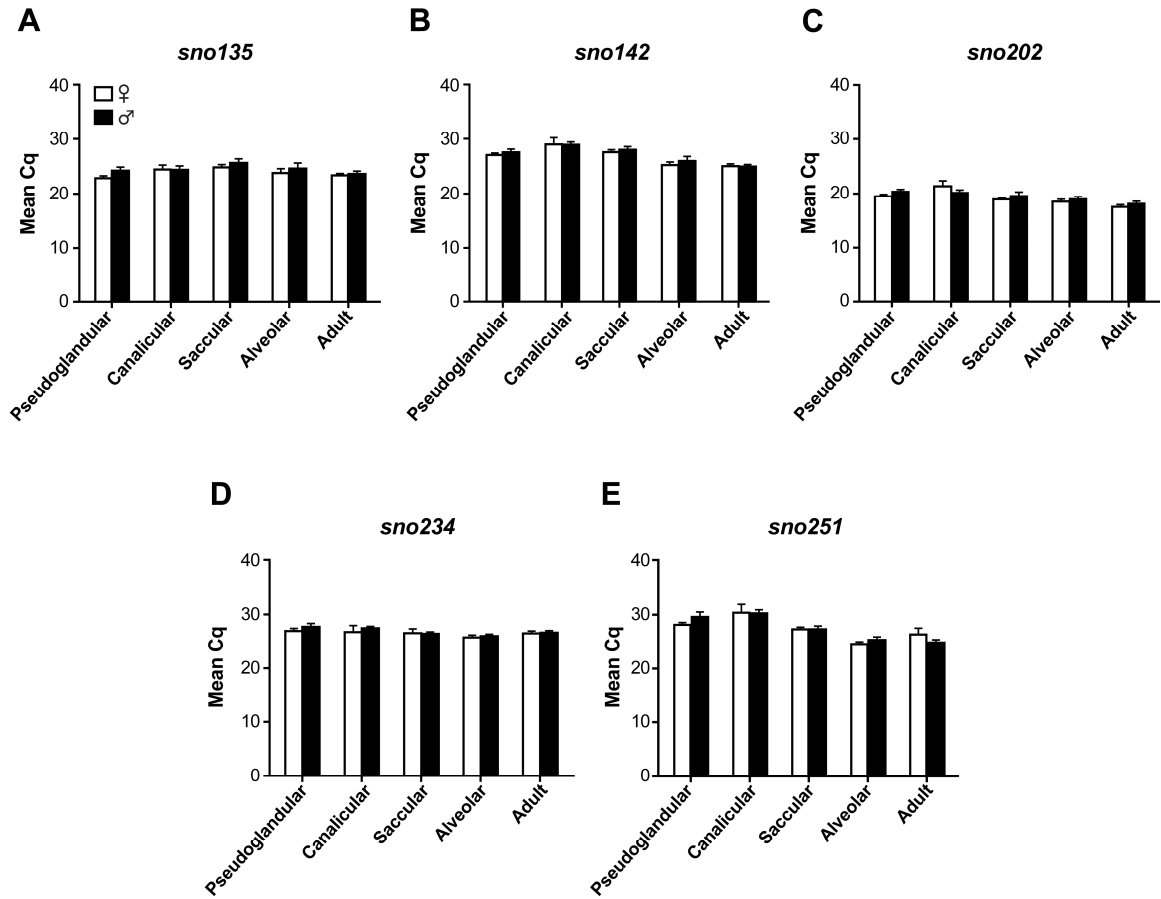
**Figure 7: Determination of optimal number of reference genes for normalization.** The pairwise variation ( $V_n/V_{n+1}$ ) was analyzed between two sequential normalization factors by geNorm. The optimal number of reference genes varies according to the developmental stage: two genes for the pseudoglandular and the canalicular stages as well as for the adult, three genes for the alveolar stage, and four genes for the saccular stage and the developing lung (from GD 15.5 to PN 30) as indicated by an asterisk.

**Figure 8: Relative expression levels of *Let-7a* in canalicular-stage lungs normalized with different pairs of housekeeping genes.** *Let-7a* RNA levels obtained by qPCR were normalized using the best pair of control genes calculated with: A) geNorm (*sno135/sno234*); B) NormFinder (*sno135/sno142*). C) qPCR data were normalized using a pair of less stable genes as estimated by geNorm and NormFinder (*sno202/sno251*). Pools of male and female lungs were used (see Table 1 for details).

**Figure 9: Relative expression levels of *Let-7a* in saccular-stage lungs normalized with different pairs of housekeeping genes.** *Let-7a* RNA levels obtained by qPCR are presented for lung RNA samples collected during the saccular stage on GD 18.0 and PN 0. Data were normalized using the best pair of control genes calculated with the saccular stage samples and with: A) geNorm (*sno135/sno142*); B) NormFinder (*sno142/sno251*). In (C), a pair of less stable genes as estimated either by geNorm or NormFinder was used (*sno202/sno234*)

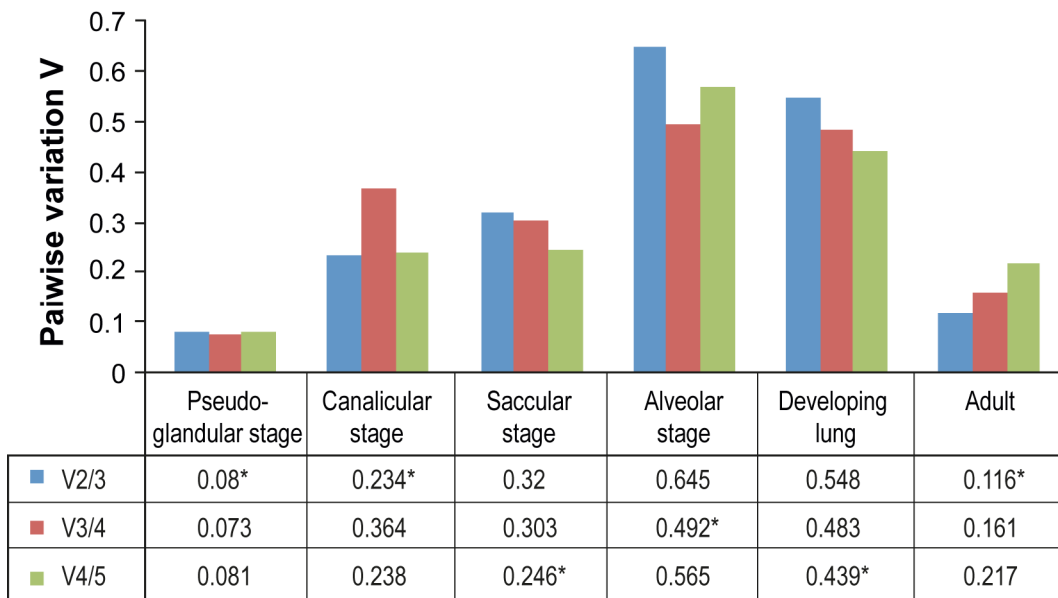
and a significant sex difference was observed on PN 0 (\*,  $P = 0.018$ , Student t-test). When the best pair calculated by geNorm using all the samples from pseudoglandular to alveolar stages (*sno135/sno234*) was used (D), no significant sex difference was observed on PN 0 ( $P = 0.109$ , Student t-test). Pools of male and female lungs were used (see Table 1 for details).

**Figure S1: Comparison of expression levels of putative housekeeping genes in the mouse developing lung and the adult lung.** Cq (mean  $\pm$  SEM) obtained by qPCR are presented for the five putative control genes for the indicated developmental stages and for adult lungs. Pools of male and female lungs were used (see Table 1 for details). The data are the same than in Fig. 6 but are presented differently.

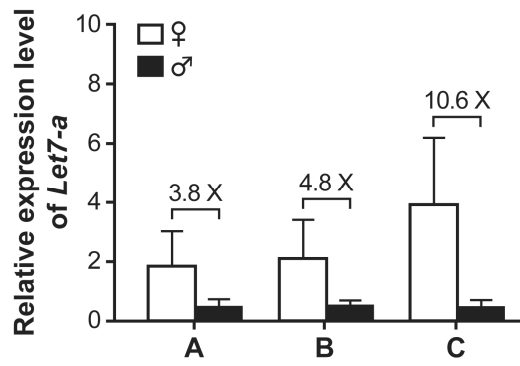


**Figure 6:** Expression levels of putative housekeeping genes in the mouse lung at different developmental stages and in the adult lung.

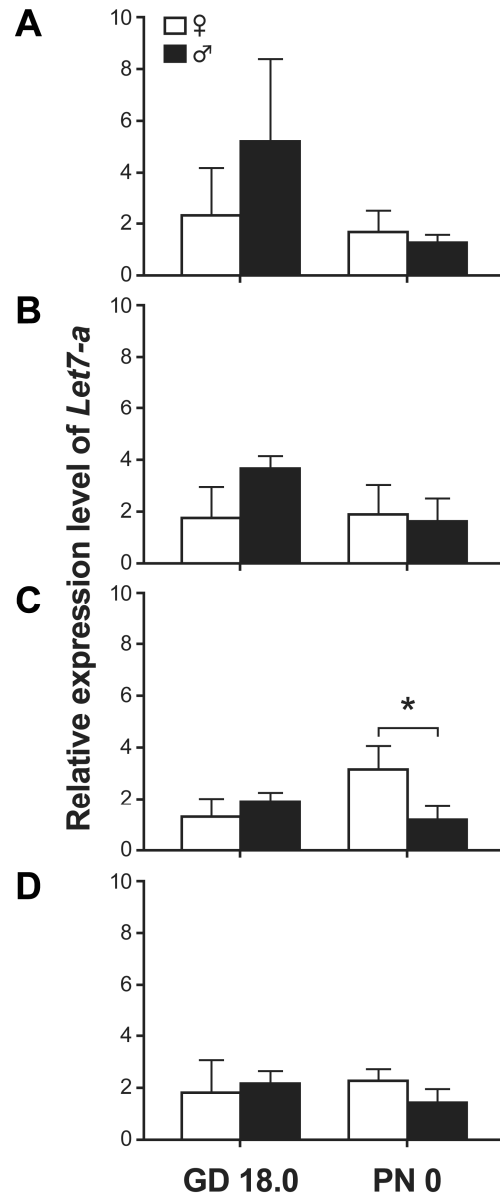




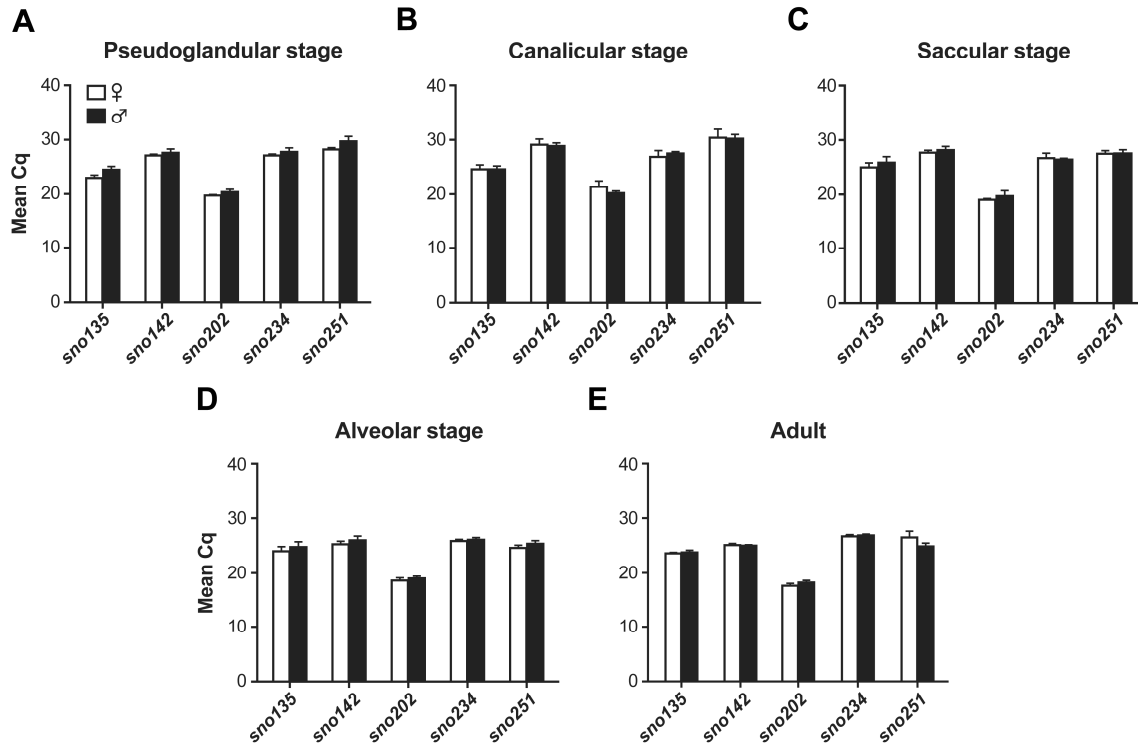
**Figure 7:** Determination of optimal number of reference genes for normalization



**Figure 8:** Relative expression levels of Let-7a in canalicular-stage lungs normalized with different pairs of housekeeping genes.



**Figure 9:** Relative expression levels of Let-7a in saccular-stage lungs normalized with different pairs of housekeeping genes.



**Figure S1:** Comparison of expression levels of putative housekeeping genes in the mouse developing lung and the adult lung.

**Table 1:** Lung developmental stages and number of fetuses used

Developmental stage	Age	Number of male	Number of female
		fetuses /pool (n=3 litters)	fetuses /pool (n=3 litters)
Pseudoglandular	GD 15.5	2 / 2 / 4	6 / 3 / 2
Canalicular	GD 17.0	4 / 3 / 3	3 / 7 / 3
Saccular	GD 18.0	2 / 7 / 2	7 / 2 / 3
	PN 0	6 / 2 / 3	2 / 5 / 4
Alveolar	PN 7	3 / 5 / 3	2 / 2 / 2
	PN 15	3 / 2 / 2	3 / 2 / 3
	PN 30	2 / 2 / 3	2 / 2 / 4

GD, gestational day

PN, postnatal day

**Table 2:** Putative endogenous control genes and primers used for reverse transcription and qPCR

Gene	NCBI Accession Number	Reverse transcription primer <sup>a,b</sup>	PCR Efficiency
		<b>qPCR forward primer<sup>c,d</sup></b>	
sno135	AF357323	<b>RT</b> 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC <b>CTTCAG</b> -3' <b>F</b> 5'-GCGGCGGCTAAAATAGCTGGAA-3'	1,83
sno142	AF357324	<b>RT</b> 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC <b>TTCTC</b> -3' <b>F</b> 5'-GCGGCGGGTCAGTGCCACGTGT-3'	1,99
sno202	AF357327	<b>RT</b> 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC <b>CATCAG</b> -3' <b>F</b> 5'-GCGGCGGGCTGTACTGACTTGA-3'	1,95
sno234	AF357329	<b>RT</b> 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC <b>TCTCAG</b> -3' <b>F</b> 5'-GCGGCGGCTTTTGGAACTGAAT-3'	1,81
sno251	AF357332	<b>RT</b> 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC <b>CTGGCT</b> -3' <b>F</b> 5'-GCGGCGGATACATACTTGCCCT-3'	1,99

<sup>a</sup>Nucleotide sequences in bold are specific to each gene.

<sup>b</sup>RT: Reverse transcription

<sup>c</sup>The reverse primer for qPCR is the same for all the genes and corresponds to a segment of the reverse transcription primers: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' ([Varkonyi-Gasic and Hellens, 2010](#)).

<sup>d</sup>F: Forward

**Table 3:** Stability values of housekeeping gene expression in lungs at different developmental stages for each sex

Developmental Stage	Sex	Rank	geNorm <sup>a</sup>		NormFinder <sup>b</sup>		BestKeeper <sup>c</sup>	
			Gene	Stability	Gene	Stability	Gene	SD
Pseudoglandular	♀	1	<i>sno234</i>	0,186	<i>sno234</i>	0,049	<i>sno202</i>	0,248
		2	<i>sno142</i>	0,212	<i>sno142</i>	0,085	<i>sno142</i>	0,313
		3	<i>sno202</i>	0,258	<i>sno251</i>	0,149	<i>sno234</i>	0,370
		4	<i>sno251</i>	0,265	<i>sno202</i>	0,156	<i>sno251</i>	0,488
		5	<i>sno135</i>	0,292	<i>sno135</i>	0,174	<i>sno135</i>	0,649
	♂	1	<i>sno234</i>	0,263	<i>sno234</i>	0,026	<i>sno202</i>	0,588
		2	<i>sno142</i>	0,289	<i>sno142</i>	0,096	<i>sno135</i>	0,778
		3	<i>sno135</i>	0,313	<i>sno135</i>	0,174	<i>sno234</i>	0,862
		4	<i>sno202</i>	0,328	<i>sno202</i>	0,192	<i>sno142</i>	0,891
		5	<i>sno251</i>	0,463	<i>sno251</i>	0,300	<i>sno251</i>	1,141
Canalicular	♀	1	<i>sno142</i>	1,289	<i>sno142</i>	0,390	<i>sno135</i>	1,054
		2	<i>sno135</i>	1,344	<i>sno135</i>	0,477	<i>sno142</i>	1,401
		3	<i>sno234</i>	1,609	<i>sno202</i>	0,919	<i>sno202</i>	1,433
		4	<i>sno202</i>	1,614	<i>sno234</i>	1,005	<i>sno234</i>	1,473
		5	<i>sno251</i>	1,784	<i>sno251</i>	1,144	<i>sno251</i>	2,069
	♂	1	<i>sno135</i>	0,572	<i>sno135</i>	0,170	<i>sno234</i>	0,424
		2	<i>sno202</i>	0,591	<i>sno234</i>	0,312	<i>sno202</i>	0,506
		3	<i>sno234</i>	0,605	<i>sno202</i>	0,314	<i>sno142</i>	0,701
		4	<i>sno251</i>	0,778	<i>sno251</i>	0,434	<i>sno135</i>	0,792
		5	<i>sno142</i>	0,843	<i>sno142</i>	0,510	<i>sno251</i>	0,977
Saccular	♀	1	<i>sno251</i>	0,900	<i>sno251</i>	0,271	<i>sno202</i>	0,351
		2	<i>sno142</i>	0,936	<i>sno142</i>	0,383	<i>sno142</i>	0,555
		3	<i>sno135</i>	0,975	<i>sno135</i>	0,454	<i>sno251</i>	0,785
		4	<i>sno202</i>	1,025	<i>sno202</i>	0,480	<i>sno135</i>	0,942
		5	<i>sno234</i>	1,392	<i>sno234</i>	0,878	<i>sno234</i>	1,226
	♂	1	<i>sno142</i>	1,141	<i>sno142</i>	0,188	<i>sno234</i>	0,433
		2	<i>sno234</i>	1,383	<i>sno234</i>	0,688	<i>sno142</i>	0,857
		3	<i>sno202</i>	1,478	<i>sno202</i>	0,796	<i>sno251</i>	1,096
		4	<i>sno135</i>	1,495	<i>sno135</i>	0,824	<i>sno202</i>	1,356
		5	<i>sno251</i>	1,525	<i>sno251</i>	0,880	<i>sno135</i>	1,391
Alveolar	♀	1	<i>sno234</i>	1,650	<i>sno234</i>	0,127	<i>sno234</i>	0,725
		2	<i>sno142</i>	1,894	<i>sno251</i>	0,699	<i>sno251</i>	1,084
		3	<i>sno251</i>	1,975	<i>sno142</i>	0,756	<i>sno142</i>	1,252
		4	<i>sno135</i>	2,149	<i>sno135</i>	1,256	<i>sno202</i>	1,277
		5	<i>sno202</i>	2,883	<i>sno202</i>	1,877	<i>sno135</i>	2,098
	♂	1	<i>sno234</i>	2,332	<i>sno251</i>	0,652	<i>sno202</i>	0,841

Developing lung <sup>d</sup>	♀	2	<i>sno251</i>	2,359	<i>sno234</i>	0,838	<i>sno234</i>	0,857
		3	<i>sno142</i>	2,774	<i>sno142</i>	1,341	<i>sno251</i>	1,298
		4	<i>sno135</i>	2,781	<i>sno135</i>	1,610	<i>sno142</i>	1,509
		5	<i>sno202</i>	3,293	<i>sno202</i>	2,014	<i>sno135</i>	2,424
		1	<i>sno234</i>	1,697	<i>sno234</i>	0,481	<i>sno234</i>	0,994
	♂	2	<i>sno142</i>	1,873	<i>sno142</i>	0,819	<i>sno202</i>	1,070
		3	<i>sno135</i>	2,010	<i>sno135</i>	1,034	<i>sno135</i>	1,445
		4	<i>sno251</i>	2,109	<i>sno251</i>	1,069	<i>sno142</i>	1,482
		5	<i>sno202</i>	2,444	<i>sno202</i>	1,456	<i>sno251</i>	2,008
		1	<i>sno234</i>	1,939	<i>sno234</i>	0,604	<i>sno234</i>	0,912
Adult	♀	2	<i>sno142</i>	2,243	<i>sno142</i>	1,052	<i>sno202</i>	1,074
		3	<i>sno251</i>	2,272	<i>sno251</i>	1,115	<i>sno142</i>	1,573
		4	<i>sno135</i>	2,363	<i>sno135</i>	1,258	<i>sno135</i>	1,697
		5	<i>sno202</i>	2,572	<i>sno202</i>	1,461	<i>sno251</i>	1,987
		1	<i>sno234</i>	0,515	<i>sno142</i>	0,017	<i>sno135</i>	0,178
	♂	2	<i>sno142</i>	0,527	<i>sno234</i>	0,017	<i>sno234</i>	0,303
		3	<i>sno135</i>	0,560	<i>sno135</i>	0,063	<i>sno142</i>	0,328
		4	<i>sno202</i>	1,132	<i>sno202</i>	0,767	<i>sno202</i>	0,465
		5	<i>sno251</i>	1,156	<i>sno251</i>	0,785	<i>sno251</i>	1,138
		1	<i>sno135</i>	0,309	<i>sno135</i>	0,048	<i>sno142</i>	0,168
♂	2	<i>sno202</i>	0,343	<i>sno142</i>	0,061	<i>sno234</i>	0,205	
	3	<i>sno142</i>	0,352	<i>sno202</i>	0,145	<i>sno135</i>	0,368	
	4	<i>sno251</i>	0,429	<i>sno251</i>	0,271	<i>sno202</i>	0,420	
	5	<i>sno234</i>	0,724	<i>sno234</i>	0,498	<i>sno251</i>	0,577	

<sup>a</sup>*M* stability values are calculated by geNorm. Gene stability increases while *M* value decreases.

<sup>b</sup>Stability values are calculated by NormFinder, Gene stability increases while stability value decreases.

<sup>c</sup>Standard deviation (SD) is calculated by BestKeeper. Gene stability increases while SD value decreases.

<sup>d</sup>All studied developmental stages.



**Table 4:** Housekeeping gene stability values in lungs at different developmental stages with both sexes combined

Stage	Rank	geNorm <sup>a</sup>		NormFinder <sup>b</sup>		BestKeeper <sup>c</sup>	
		Gene	Stability	Gene	Stability	Gene	SD
Pseudoglandular	1	<i>sno234</i>	0,259	<i>sno234</i>	0,073	<i>sno202</i>	0,468
	2	<i>sno142</i>	0,299	<i>sno142</i>	0,134	<i>sno142</i>	0,612
	3	<i>sno202</i>	0,326	<i>sno202</i>	0,144	<i>sno234</i>	0,694
	4	<i>sno135</i>	0,342	<i>sno135</i>	0,146	<i>sno135</i>	0,849
	5	<i>sno251</i>	0,437	<i>sno251</i>	0,195	<i>sno251</i>	1,058
	<b>Best combination</b>		<i>sno142/sno234</i>	0,130	<i>sno135/sno234</i>	0,074	
Canalicular	1	<i>sno135</i>	1,013	<i>sno135</i>	0,187	<i>sno135</i>	0,923
	2	<i>sno142</i>	1,068	<i>sno142</i>	0,260	<i>sno142</i>	1,023
	3	<i>sno234</i>	1,238	<i>sno202</i>	0,356	<i>sno234</i>	1,037
	4	<i>sno202</i>	1,336	<i>sno234</i>	0,380	<i>sno202</i>	1,124
	5	<i>sno251</i>	1,341	<i>sno251</i>	0,456	<i>sno251</i>	1,550
	<b>Best combination</b>		<i>sno135/sno234</i>	0,601	<i>sno135/sno142</i>	0,166	
Saccular	1	<i>sno142</i>	1,027	<i>sno142</i>	0,116	<i>sno142</i>	0,697
	2	<i>sno135</i>	1,244	<i>sno251</i>	0,235	<i>sno234</i>	0,830
	3	<i>sno202</i>	1,244	<i>sno202</i>	0,261	<i>sno202</i>	0,909
	4	<i>sno251</i>	1,260	<i>sno135</i>	0,261	<i>sno251</i>	0,938
	5	<i>sno234</i>	1,404	<i>sno234</i>	0,320	<i>sno135</i>	1,299
	<b>Best combination</b>		<i>sno135/sno142</i>	0,752	<i>sno142/sno251</i>	0,139	
Alveolar	1	<i>sno234</i>	1,990	<i>sno234</i>	0,161	<i>sno234</i>	0,780
	2	<i>sno251</i>	2,139	<i>sno251</i>	0,225	<i>sno202</i>	1,066
	3	<i>sno142</i>	2,351	<i>sno142</i>	0,350	<i>sno251</i>	1,262
	4	<i>sno135</i>	2,445	<i>sno135</i>	0,478	<i>sno142</i>	1,423
	5	<i>sno202</i>	3,023	<i>sno202</i>	0,649	<i>sno135</i>	2,237
	<b>Best combination</b>		<i>sno135/sno234</i>	0,147	<i>sno234/sno251</i>	0,222	
Developing lung <sup>d</sup>	1	<i>sno234</i>	1,816	<i>sno234</i>	0,118	<i>sno135</i>	1,586
	2	<i>sno142</i>	2,058	<i>sno142</i>	0,204	<i>sno142</i>	1,527
	3	<i>sno251</i>	2,178	<i>sno251</i>	0,238	<i>sno234</i>	0,955
	4	<i>sno135</i>	2,179	<i>sno135</i>	0,250	<i>sno202</i>	1,069
	5	<i>sno202</i>	2,488	<i>sno202</i>	0,318	<i>sno251</i>	1,979
	<b>Best combination</b>		<i>sno135/sno234</i>	1,466	<i>sno142/sno234</i>	0,118	
Adult	1	<i>sno142</i>	0,528	<i>sno142</i>	0,044	<i>sno142</i>	0,248
	2	<i>sno135</i>	0,538	<i>sno135</i>	0,134	<i>sno234</i>	0,254
	3	<i>sno234</i>	0,643	<i>sno234</i>	0,255	<i>sno135</i>	0,273

4	<i>sno202</i>	0,867	<i>sno202</i>	0,452	<i>sno202</i>	0,443
5	<i>sno251</i>	1,110	<i>sno251</i>	0,521	<i>sno251</i>	0,969
<b>Best combination</b>	<i>sno135/sno142</i>	0,082	<i>sno135/sno142</i>	0,083		

---

<sup>a</sup>M stability values calculated with the geNorm software

<sup>b</sup>Stability values calculated with the NormFinder software

<sup>c</sup>Standard deviation (SD) is calculated by BestKeeper. Gene stability increases while SD value decreases.

<sup>d</sup>All studied developmental stages.

### **Chapitre III: Profil d'expression des microARNs sous l'effet des androgènes dans le poumon fœtal murin**

Article publié dans le journal *Biology Of Sex Differences* ([Bouhaddioui et al., 2016b](#)) sous le titre :

***Expression profile of androgen-modulated microRNAs in the fetal murine lung***

## Résumé en français de l'étude

**Contexte:** Les androgènes sont reconnus pour retarder le développement pulmonaire. En conséquence, l'incidence et la morbidité du syndrome de détresse respiratoire du nouveau-né sont plus élevées chez les prématurés de sexe masculin comparativement au sexe féminin. Nous avons précédemment rapporté que de nombreux gènes sont exprimés avec une différence sexuelle dans le poumon foetal murin et que plusieurs gènes sont sous le contrôle des androgènes dans le poumon foetal mâle. Les microARNs sont des petits ARNs non-codants connus pour réguler négativement l'expression des gènes. Dans cette étude, nous avons examiné chez la souris si les microARNs pulmonaires sont sous le contrôle des androgènes chez des foetus mâles.

**Méthodes:** Le profilage de l'expression des microARNs a été réalisé par des micropuces en utilisant l'ARN extrait de poumons foetaux mâles isolés aux jours gestationnels (JG) 17.0 et 18.0. Les souris gestantes ont été injectées une fois par jour avec l'antiandrogène flutamide ou avec le véhicule à partir du JG 10. Les données de cette étude ont été combinées avec les données de profilage de gènes obtenues précédemment avec les mêmes échantillons afin d'identifier les cibles potentielles des miARNs. La qPCR a été utilisée pour confirmer les données de micropuces avec des poumons foetaux provenant d'autres portées que celles utilisées dans l'étude de profilage.

**Résultats:** Le flutamide induit la régulation de plusieurs miARNs au JG 17.0 et au JG 18.0. Sur les 43 miARNs matures modulés par le flutamide au JG 17.0, 60% sont régulés à la baisse, alors que cette proportion est de 34% pour les 35 miARNs matures modulés au JG 18.0. Pour 29 et 26 miARNs qui répondent au flutamide au JG 17.0 et au JG 18.0 respectivement, nous avons identifié les cibles correspondantes qui sont inversement régulées par les androgènes. Les gènes cibles régulés par les androgènes sont impliqués dans plusieurs processus biologiques (le métabolisme des lipides, la prolifération cellulaire et le développement pulmonaire) et des fonctions moléculaires principalement la liaison aux facteurs de transcription.

**Conclusions:** La régulation du développement pulmonaire chez les fœtus mâles implique plusieurs miARNs qui sont modulés *in vivo* par les androgènes.

## **Expression profile of androgen-modulated microRNAs in the fetal murine lung**

Wafae Bouhaddioui<sup>1,3</sup>, Pierre R. Provost<sup>1,2,3</sup> and Yves Tremblay<sup>\*1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Reproduction, Mother and Youth Health, Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, QC, Canada

<sup>2</sup> Department of Obstetrics/Gynecology & Reproduction, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

<sup>3</sup>Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR), Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada

**\*Corresponding author/to whom reprint requests should be addressed:**

Yves Tremblay, Ph.D.

Department of Obstetrics/Gynecology & Reproduction

Reproduction, Mother and Youth Health, Centre de recherche du CHU de Québec

2705 Laurier Boulevard, Rm T-3-67, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

Phone : 1-418-525-4444 #46158; Fax: 1-418-654-2783

E-mail: [yves.tremblay@crchudequebec.ulaval.ca](mailto:yves.tremblay@crchudequebec.ulaval.ca)

## Abstract

**Background:** Androgens are known to delay lung development. As a consequence, the incidence and morbidity of respiratory distress syndrome of the neonate are higher for male than for female premature infants. We previously reported that many genes were expressed with a sex difference in the mouse developing lung and that several genes were under the control of androgens in the male fetal lung. microRNAs are small non-coding RNAs known to negatively regulate the expression of specific genes. In this study, we examined whether murine miRNAs are under the control of androgens in the male developing lung.

**Methods:** Expression profiling of microRNAs was performed by microarrays using RNA extracted from male fetal lungs isolated on gestational day (GD) 17.0 and GD 18.0 after daily injection of pregnant mice from GD 10.0 with the antiandrogen flutamide or vehicle only. To identify putative miRNA target genes, the data obtained here were combined with gene profiling data reported previously using the same RNA preparations. qPCR was used to confirm microarray data with fetal lungs from other litters than those used in microarrays.

**Results:** Flutamide induced downregulation and upregulation of several miRNAs on GD 17.0 and GD 18.0. Of the 43 mature miRNAs modulated by flutamide on GD 17.0, 60% were downregulated, whereas this proportion was only of 34% for the 35 mature miRNAs modulated on GD 18.0. For 29 and 26 flutamide-responsive miRNAs, we found a corresponding target inversely regulated by androgens on GD 17.0 and 18.0, respectively. The androgen-regulated target genes were involved in several biological processes (lipid metabolism, cell proliferation, and lung development) and molecular functions, mainly transcription factor binding.

**Conclusions:** Regulation of male lung development involves several miRNAs that are under androgen modulation *in vivo*.

**Keywords:** microRNA, Androgens, Preterm birth, Sex differences, Respiratory distress syndrome, Lung development, Surfactant

### III-1 Background

Respiratory distress syndrome (RDS) is one of the most common complications of preterm babies ([Brunnemann et al., 2013](#)). The major cause of this disease is surfactant deficiency ([Avery and Mead, 1959](#); [Grenache and Gronowski, 2006](#)), which is related to the immaturity of type II pneumocytes (PTII), the surfactant-producing and -secreting cells ([Torday, 1984](#)). Clinically, RDS is characterized by a sexual dimorphism with preterm boys more affected than preterm girls ([Baum et al., 2000](#); [Pollak and Birnbacher, 2004](#)). This would be explained by a sexual difference in the timing of PTII cell maturation and the surge of surfactant synthesis leading to a disadvantage for male neonates ([Nielsen, 1986](#); [Nielsen and Torday, 1981](#); [Seaborn et al., 2010](#)). Indeed, treatments *in vitro* and *in vivo* with the androgen dihydrotestosterone (DHT) or the antiandrogen flutamide demonstrated that androgens are responsible for the delay in PTII cell maturation and in the surge of surfactant synthesis in males ([Nielsen et al., 1982](#); [Torday, 1990](#)). Additionally, experiments with testicular feminization mice (Tfm) showed that these negative actions of androgens occur via the androgen receptor (AR) ([Nielsen, 1985](#)) which is expressed in both male and female fetal lungs ([Provost et al., 2004](#)).

We previously reported that the expression profile of many genes presented a sexual dimorphism in the fetal lung at the end of the pseudoglandular ([Simard et al., 2006](#)), during the canalicular ([Bresson et al., 2010](#); [Simard et al., 2006](#)) and at the beginning of the sacular stage of lung development ([Bresson et al., 2010](#)). Furthermore, we demonstrated that several genes were actively modulated by androgens *in vivo* on gestation days (GD) 17.0 and 18.0 ([Bresson et al., 2010](#)), a period including the surge of surfactant synthesis and the transition from the canalicular to the sacular stage. Since androgens have an important impact on the timing of lung maturation, it is important to deepen our knowledge on the regulatory mechanisms involved downstream of the activation of the androgen receptor.



miRNAs are small non-coding RNAs known to negatively regulate expression of specific gene(s) by degrading mRNA(s) or inhibiting its/their translation into protein ([He and Hannon, 2004](#)). miRNAs are highly conserved across species ([Grosshans and Slack, 2002](#)). They are involved in several physiological processes such as cell differentiation, proliferation, apoptosis and lipid metabolism ([Carraro et al., 2009](#); [Chen et al., 2006](#); [Esau et al., 2006](#); [Jovanovic and Hengartner, 2006](#)). The importance of miRNAs in lung development was first demonstrated by Harris and al, who reported abnormal growth of epithelial tube and an arrest of branching were observed in conditional knockout mice of *Dicer*, an important ribonuclease involved in biogenesis of mature miRNAs ([Harris et al., 2006](#)). It was also demonstrated on GD 11.5 that two members of the Argonaute protein family, AGO1 and AGO2, were specifically expressed in lung distal epithelium and mesenchymal cells, respectively ([Lu et al., 2005](#)). Therefore, these two RNA-induced silencing complex (RISC) components must be involved in cell-specific gene regulation. Finally, it was showed that miRNA were dynamically regulated across lung development from the pseudoglandular to the alveolar stage ([Dong et al., 2010](#)).

Several miRNAs display a sexual dimorphism in their expression levels in different species ([Koturbash et al., 2011](#); [Marco et al., 2013](#); [Wu et al., 2013](#)). Regulation of miRNA levels by sex steroids such as estradiol, progesterone and testosterone has also been demonstrated ([Bhat-Nakshatri et al., 2009](#); [Lam et al., 2012](#); [Waltering et al., 2011](#)). A previous study reported sex differences in miRNA levels in the developing lung between GD15 and GD18 ([Mujahid et al., 2013a](#)). However, no study has examined sex steroid modulation of miRNA levels in fetal lungs. In the present study, using the antiandrogen flutamide, we investigated for the first time whether androgens modulate miRNAs expression in fetal murine lung during a developmental time overlapping the surge of surfactant synthesis.

## III-2 Methods

### III-2-1 Animals and housing

Protocols were approved by the Comité de protection des animaux du CHU de Québec (protocol no. 2011-053). Female and male Balb/c mice (Charles River Laboratories St-Constant, QC, Canada) were housed with a 12-h light/dark cycle. Tap water and feed were provided ad libitum. Animals were mated in a one hour mating window as previously described ([Bresson et al., 2010](#)). Pregnant females received a daily subcutaneous injection of 1 mg of the antiandrogen flutamide (kindly provided by Dr Fernand Labrie) in 200 µl vehicle (0.9% NaCl, 1% gelatin (W/V) (ACP Chemicals, Saint-Léonard, QC, Canada), 10% dimethylsulfoxide (Sigma, St. Louis, MO)) or vehicle only from GD 10 to the day prior to sacrifice. Pregnant females were sacrificed on GD 17.0 or GD 18.0 (term is GD 19) by exposure to CO<sub>2</sub>. GD17.0 corresponded exactly to 17 days 0 hour after the end of the one hour mating window. From each fetus, lungs and a rear leg were harvested, rapidly frozen on dry ice, and then stored at -80°C until use.

### III-2-2 Fetal sex determination

Fetal sex was confirmed by PCR amplification of the male-specific *Sry* gene (GenBank: X67204) from fetal legs. DNAs were extracted with Extracta DNA Prep for PCR - Tissue (Quanta BioSciences). PCR reactions were performed using AccuStart PCR SuperMix Kit (Quanta BioSciences) according to the protocol of the manufacturer with 0.04 nM of each *Sry* primer (forward: 5'-TATGGTGTGGTCCCGTGGTG-3'; reverse: 5'-ATGTGATGGCATGTGGGTTCC-3'), resulting in a 282-nucleotide amplicon. The following PCR conditions were used: 94°C for 5 min. and 72°C for 10 min. followed by 34 cycles of 94°C for 1 min., 65°C for 1 min. and 72°C for 1 min. Final extension was done at 72°C for 10 min. Agarose gel electrophoresis was used for amplicon visualization.

### **III-2-3 RNA extraction and sampling**

Total RNA was extracted from fetal lung of male subjects using Tri-reagent, a mixture of phenol and guanidine thiocyanate in a monophasic solution (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) and purified on a CsCl gradient as previously described ([Provost et al., 2004](#)). The quality of RNA for microarray experiments was monitored by micro-capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For qPCR experiments, the RNA integrity was verified by gel electrophoresis. For all the experiments, RNA purity was determined using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). For all the samples, the OD260/280 ratio was above 1.8. For microarray experiments, biological duplicates (n=2 RNA pools) were prepared for each experimental condition with RNA from 4 to 5 male fetuses for each pool.

### **III-2-4 Microarray experiments**

Total RNA including low molecular weight RNA was labelled using the Flashtag RNA labeling kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, for each sample, 400 ng of total RNA were subjected to a tailing reaction followed by the ligation of the biotinylated signal molecule to the target RNA sample. Each sample was hybridized to a GeneChip® miRNA Array 3.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) for 16 h at 48°C at 60 rpm. After washing and staining with a Fluidics Station 450 (Fluidics script FS450\_0002), arrays were scanned with a GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix). The image data were analyzed with the Expression Console Software ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) for quality control. GeneChip® miRNA Array 3.0 contained 19,724 total mature miRNA probe sets and covered 153 organisms. This array contained 1 111 and 855 mouse mature miRNA and pre-miRNA, respectively. miRNA probes of this array were derived from the Sanger miRBase miRNA database v17.

### **III-2-5 Microarray data analysis**

CEL files were imported and analyzed with the Partek Genomics Suite 6.6 software (Partek Incorporated, St Louis, MO, USA). Background correction and normalization of probe set intensities were performed using the Robust Multiarray Analysis (RMA) method ([Irizarry et al., 2003](#)). Quantile normalization was achieved and intensity values were Log<sub>2</sub> transformed. Groups were compared by ANOVA analysis and p-values were corrected using the false discovery rate (FDR) procedure. The differences were considered statistically significant when p < 0.05 and FDR < 5%. miRNAs were combined with their corresponding targets belonging to the GEO (GSE18135) data sets by Partek software based on the TargetScanMouse v6.2 algorithm.

### **III-2-6 Reverse transcription and quantitative PCR**

Reverse transcription and qPCR of miRNAs and normalization genes were performed as previously described ([Varkonyi-Gasic and Hellens, 2010](#)). Briefly, 200 ng of each RNA sample were denatured and mixed with 62.5 μM of each dNTP and 50 nM of the stem-loop primer at 65°C for 5 min, and then transferred on ice. First-strand buffer (SuperScript II kit, Life Technologies), 4 units of Protector RNase Inhibitor (Promega) and 50 units of SuperScript II RT (Life Technologies) were added to the mixture for a total reaction volume of 20 μl. Samples were incubated for 30 min. at 16°C, followed by pulsed reverse transcription of 60 cycles at 30°C for 30 sec, 42°C for 30 sec and 50°C for 1 sec. Reverse transcriptase was then inactivated at 85°C for 5 min. qPCR was performed using the FastStart Essential DNA Green qPCR Master Mix kits and a LC96 Instrument (Roche Diagnostics). Reactions were performed according to the manufacturer's

instructions with 0.5  $\mu$ M of each primer and 20 ng of total RNA input in a final volume of 20  $\mu$ l. Samples were incubated at 95°C for 5 min, followed by 43 cycles of 95°C for 5 sec and 60°C for 10 sec. At the end of each run, samples were heated to 95°C with a temperature transition rate of 0.2°C/ sec to construct dissociation curves. The stability of five normalization genes was assessed by geNorm software as previously described ([Vandesompele et al., 2002](#)). The best combination of reference genes was used for relative quantification of microRNAs. The list of reverse transcription and qPCR primers for miRNAs and normalization genes are presented in Table S1. The groups were compared using unpaired Student's *t*-test. The differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . A Chi-square test (2X2 table) was performed to analyze the significance of the variation in the proportions of miRNAs regulated by flutamide between GD 17.0 and GD 18.0.

### **III-3 Results**

#### **III-3-1 Androgen-regulated miRNA expression**

Pregnant females were subjected to the antiandrogen flutamide or vehicle administration from GD 10 to the day prior sacrifice on GD 17.0 or 18.0. For each experimental condition, two biological replicates were studied. Each replicate contained lung RNA from several individual male fetuses belonging to different litters. Expression profiling of androgen-regulated miRNA was assessed by

microarrays. For each gestation time, expression data from flutamide-treated males was compared with data from males injected with vehicle. Androgen-regulated miRNA were detected on GD 17.0 and GD 18.0 (Figure 10 A). Only two miRNAs overlapped the two gestational ages. The expression profile of differentially expressed miRNAs is presented for each replica (Figure 10 B). Of the 43 mature miRNAs modulated by flutamide on GD 17.0, 60% were down-regulated, whereas this proportion was only of 34% for the 35 mature miRNAs modulated on GD 18.0 (Figure 10 C). This difference was statistically significant (Chi-square 5.29,  $p=0.021$ ).

### **III-3-2 qPCR analysis of microarray data**

After obtaining microarray data, animal breeding was reinitiated to produce independent RNA/cDNA samples to validate microarray data by qPCR. In contrast to RNA samples for microarrays, RNAs for qPCR were pooled by litter (one pool of male fetal lung RNA /litter). Three RNA pools were obtained for vehicle treatment for each age, while 5 pools were used for flutamide treatment for each age. Five reference genes were tested by geNorm: sno202, sno234, sno251, sno135, and sno142. Two were selected for normalization: sno202 and sno135 (Figure 11A). Eleven miRNAs were randomly selected for qPCR analysis for each age: GD 17.0: miR-1843-5p; miR-485-3p; miR-711; miR-3962; miR-3067-3p; miR-212-3p; miR-669i; miR-877; miR-26b-3p; miR-465c-3p; let-7b-3p; GD 18.0: miR-1843-5p; miR-485-3p; miR-3473d; miR-132-5p; miR-3074-1-3p; miR-128-2-5p; miR-130b-5p;

miR-490-5p; miR-669h-3p; miR-3058-5p; miR-146b. A statistically significant effect of flutamide was observed for 7 of these miRNAs (miR-26b-3p; let-7b-3p; miR-465c-3p; miR-669h-3p; miR-3058-5p; miR-146b; miR-1843-5p) and a trend toward a statistically significant effect was observed for another miRNA (miR-130b-5p) (Fig 11B, C). For the other miRNAs, variations in expression levels from litter to litter prevented obtaining statistically significant differences (data not shown). The seven miRNAs presenting a statistically significant effect of flutamide and miR-130b-5p were used to compare qPCR and microarray data. All of them showed a similar effect of flutamide by qPCR and microarrays (Figure 11D). According to the miRNA quality control (miRQC) study reported in 2014 ([Mestdagh et al., 2014](#)), microarrays and qPCR approaches presented a concordance rate lower than 70% for quantification of miRNA expression.

### **III-3-3 Functional analysis of androgen modulated miRNA**

For microarrays, we utilized the RNA preparations that were used in our previous publication studying expression profiling of androgen modulated genes ([Bresson et al., 2010](#)). Thus, the present miRNA profiling data were combined with the mRNA profiling data in order to pair miRNA with their potential targets showing an opposite regulation by flutamide. *In silico* miRNA-mRNA combination was performed. For 29 and 26 of the flutamide-responsive mature miRNAs, we found a corresponding target inversely regulated by androgens on GD 17.0 and 18.0, respectively. Among all these mRNA targets, 25 were common to GD 17.0 and GD 18.0. Gene Ontology (GO) analysis was performed to determine biological processes (Figure 12) and molecular functions (Figure 13) involving androgen-regulated miRNAs and their corresponding targets. Among the biological

processes, lipid metabolism, cell proliferation, lung development, Wnt signalling pathway, and angiogenesis showed the highest number of genes targeted by miRNAs for the two gestational ages (Figure 12, Table 5 and Table 7). For the molecular functions, transcription factor binding was the group with the highest number of targeted genes (Figure 13) on GD 17.0 (Table 6) and GD 18.0 (Table 8).

The following miRNAs, shown to be involved in lung development, were not modulated by flutamide in our experiment: miR-221 ([Mujahid et al., 2013b](#)), miR-429/200a/200b/200c/141 from the miR-200 family ([Benlhabib et al., 2015](#)), miR-150 ([Weng et al., 2012](#)), miR-142 ([Carraro et al., 2014](#)), miR-127 ([Bhaskaran et al., 2009](#)), miR-375 ([Wang et al., 2013](#)), and miR-26a ([Zhang et al., 2014](#)).

### **III-4 Discussion**

The importance of miRNAs in lung development has been reported in several studies ([Johar et al., 2015](#)). Knowing that androgens modulate lung development ([Seaborn et al., 2010](#); [Tremblay and Provost, 2013](#)), we investigated the possibility that several androgen effects be mediated by the regulation of miRNAs. We demonstrate for the first time in this report that the levels of several miRNAs are modulated by androgens in late developing lungs on GDs 17.0 and 18.0. These two gestational days overlap the transition period from the canalicular to the sacular stages. The canalicular stage is characterized by the formation of distal airway bronchioles, epithelial differentiation into type I and type II pneumocytes, and the beginning of angiogenesis. The sacular stage includes the formation of terminal saccules, epithelial cell thinning and growth of capillary networks. Between GDs 17.0 and 18.0, important changes in lung morphogenesis occur, which are accompanied by variations in the expression of several genes. These dynamic changes are compatible with our data showing a different profile of androgen-modulated miRNAs for each age, with only two miRNAs in common between the



two gestational days. In fact, 76 miRNAs were modulated by androgens. Of these, 41 and 33 were specifically modulated on GD 17.0 and GD 18.0, respectively.

We previously demonstrated that 1597 and 1775 genes were modulated by flutamide on GD 17.0 and GD 18.0, respectively, in the fetal mouse lung ([Bresson et al., 2010](#)). Of these, only 590 and 428 genes, respectively, presented a sex difference ([Bresson et al., 2010](#)). Based on the demonstration that steroidogenic enzymes involved in the synthesis and inactivation of androgens are expressed in the developing lung of both sexes, a role for androgens was proposed in lung development of females as well as males ([Boucher et al., 2009](#); [Provost et al., 2004](#); [Provost and Tremblay, 2007](#)). This does not exclude sex differences originating most probably from circulating androgens of testicular origin. Levels of androgen-regulated miRNAs are dependent on androgen receptor activation, which is affected by the availability of androgens, which in turn is affected by circulating amounts of androgens and by local expression of steroidogenic enzymes. One androgen synthesizing enzyme, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 5 (GenBank accession no. AH007907), and one androgen inactivating enzyme, 17 $\beta$ -HSD type 2 (NM\_008290), are both expressed in the mouse developing lung at levels that were shown to vary according to developmental time and from litter to litter ([Provost et al., 2004](#)). As a consequence, the amplitude of the effect of androgens on miRNA expression is likely to vary from litter to litter. Therefore, sampling may induce variations in the levels of androgen-regulated miRNAs. To prepare RNA pools for microarray experiments, RNA of individuals from various litters were pooled. Therefore, these samples were less subject to a variation from pool to pool than the samples for qPCR, which were prepared with individuals from only one litter per pool. qPCR experiments were designed not only to study the effect of flutamide but also to evaluate the reproducibility from litter to litter. Our data indicate that the effect of flutamide observed from the population cannot always be observed for individual litters.

The design of our study did not allow identification of target genes of miRNAs acting through the inhibition of translation but rather of those targeting mRNA stability. The particular interest of our miRNA profiling experiment is that we used the same RNA samples as those used for gene profiling of the effect of flutamide by Bresson et al. ([Bresson et al., 2010](#)). Therefore, we combined the data from the two profiling studies to select miRNA-regulated target genes showing an opposite modulation by flutamide compared to their corresponding miRNAs. Flutamide inhibits specifically the androgen receptor response. Positive and negative effects of androgens are inhibited by flutamide, leading to an apparent down-regulation or up-regulation of gene expression, respectively. Since each gene may be subjected to several miRNAs and other regulatory factors, the putative target genes of a given miRNA are not all expected to be inversely regulated compared to this miRNA. Nevertheless, our approach identified combinations of miRNAs and their mRNA targets that were inversely modulated by flutamide. Combination of the two profiling studies revealed that the target genes inversely regulated by flutamide compared to miRNAs were involved in several biological processes and molecular functions relevant to lung development such as lipid metabolism, cell proliferation and differentiation, cell-cell signaling, several signaling pathways, angiogenesis and more as presented in Figures 12 and 13.

Two miRNAs among the 20 most abundant miRNAs detected in the fetal lung on GD 17.5 ([Lu et al., 2008](#)) were down-regulated by androgens (up-regulated by flutamide) on GD 17.0 in our study, namely, miR-92a-1-5p and miR-449a. MiR-92a-1-5p belongs to the miR-17/92 cluster involved in lung morphogenesis and overexpressed in early stage of lung development ([Lu et al., 2008](#)). Accordingly, mice deficient for miR17/92 die shortly after birth with lung hypoplasia and cardiac defects ([Ventura et al., 2008](#)). Transducin (beta)-like 1X related protein 1 (TBL1XR1 or TBLR1) mRNA is a predictive target for miR-449a that is conversely regulated by androgens. The corresponding protein is involved in  $\beta$ -catenin binding since it is essential for the recruitment of  $\beta$ -catenin for Wnt- $\beta$ -catenin-mediated transcription ([Li and Wang, 2008](#)). Then, down-regulation of miR-449a by

androgens and, consequently, up-regulation of TBL1XR1 should positively regulate Wnt- $\beta$ -catenin gene expression on GD 17.0.

MiR-449a is also known to target jagged 1 (*jag1*) mRNA, which encodes the ligand of the Notch 1 receptor. It was previously demonstrated that the miR-449 family contributes to cell fate determination by targeting the notch signaling pathway ([Marcet et al., 2011](#)). Our results showed that *Jag1* mRNA is also regulated by two other miRNAs (miR-126-5p and let-7b-3p) that, like miR-449a, were up-regulated by flutamide. Moreover, two other genes also involved in the Notch signaling pathway, ADAM10 and ADAM17, were up-regulated by androgens like *Jag1*, and their miRNAs were up-regulated by flutamide (Table 5). These data strongly suggest that the Notch signaling pathway should be under androgen regulation on GD 17.0. Notch proteins and their ligands are highly expressed in lung development ([Ito et al., 2000](#); [Taichman et al., 2002](#)) since they are required for differentiation of epithelial cells, more specifically ciliated cells, in the bronchial epithelium. Our data strongly suggest that these effects of Notch signalling may be regulated positively by androgens.

It was reported that the Let-7 family, including let-7f-2-3p and let-7b-3p, are the most abundant miRNAs in the fetal lung on GD17.5 ([Lu et al., 2008](#)). It was shown that fetal lung expression levels of *mmu-let-7b-3p* were lower in early than in late developmental stages ([Bhaskaran et al., 2009](#)). Two members of the Let-7 family, let-7f-2-3p and let-7b-3p, were down-regulated by androgens in the present study. In addition to *Jag1* mRNA mentioned above, the messenger of Transducin-like enhancer of split 4 (*Tle4*) is also a let-7b-3p putative target gene down-regulated by flutamide. *Tle4* is known to be expressed in embryonic stem cells where it acts as a repressor of cell pluripotency and self-renewal, thus favoring cell differentiation ([Laing et al., 2015](#)). Given that the *Tle4* mRNA was down-regulated by flutamide in our experiments, androgens may exert a positive pressure in the favor of cell differentiation through let-7b-3p.

Our data showed that several androgen-modulated genes involved in growth factor signaling ([Bresson et al., 2010](#)) are targeted by androgen-modulated miRNAs. Among these, insulin-like growth factor 1 gene (*IGF1*) was under positive regulation by androgens through miR-215 on GD 17.0, and through miR-30e, miR-1251, miR-709, miR-344f-3p and miR-466l-5p on GD 18.0. IGF1 is involved in cell proliferation and distal epithelium differentiation in prenatal lung ([Pais et al., 2013](#)). Interestingly, *IGF1* expression was up-regulated in RDS ([Chetty et al., 2004](#)), which presented a higher incidence and morbidity for males, whereas we show in this report that IGF1 mRNA levels were up-regulated by androgens. Moreover, IGF2 mRNA levels were also positively modulated by androgens. It is a putative target of miR-215, which in turn is negatively regulated by androgens. As demonstrated by the study of *IGF2*<sup>-/-</sup> mice, a lack of IGF2 leads to a delay in lung maturation characterized by a dense pseudoglandular-like appearance on GD17.5 ([Silva et al., 2006](#)).

Nuclear receptor 2 factor 2 (*Nr2f2*), also known as Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (*COUP-TFII*), antagonizes retinoic acid (RA) signaling in the developing lung, allowing the formation of distal lung structures under the regulation of FGF10 and BMP4 ([Malpel et al., 2000](#)). Our data showed that COUP-TFII mRNA levels were down-regulated by androgens on GD17.0 but not on GD 18.0 ([Bresson et al., 2010](#)). In this report, some miRNAs putatively targeting the COUP-TFII mRNA were conversely regulated by androgens on GD 17.0: miR-291a-3p, miR-467b and miR-467d and miR467h. Therefore, these miRNAs must participate in the negative regulatory pressure of androgens on the expression of *COUP-TFII*, and thus cause a delay in the formation of distal lung structures.

MiR-130a was shown to be expressed in murine fetal lung, where a decrease in miR-130a levels was observed from GD 15 to GD 17, followed by an increase up to GD 18 ([Mujahid et al., 2013b](#)). It was observed that pulmonary localization of this miRNA changed according to gestational age and corresponded on GD 18 to

terminal bronchioles and mesenchymal cells around developing saccules ([Mujahid et al., 2013b](#)). Up-regulation of miR-130a was shown to increase vascular density and distal airway branching ([Mujahid et al., 2013b](#)). In contrast, down-regulation of miR-130a with an anti-miR led to reduced airway branching in lung explant ([Mujahid et al., 2013b](#)). Our data indicated that miR-130a levels were up-regulated by flutamide on GD 18.0. One putative miR-130a target is cAMP response element binding protein 1 (*Creb1*) mRNA. *Creb1* is also regulated by flutamide and plays an important role in differentiation of epithelial cells, mainly type I epithelial cells ([Bird et al., 2011](#)). Our data suggest that androgens exert both a positive pressure on the expression of *Creb1* and a negative pressure on vascularization and distal airway branching on GD 18.0 through miR-130a. Another putative target of miR-130a is *Zeb2* mRNA. This messenger was down-regulated by flutamide on GD 18.0 in our previous gene profiling study ([Bresson et al., 2010](#)). *Zeb2* repressed transcription of E-Cadherin and, consequently, epithelial cell polarity and adhesion ([Vandewalle et al., 2005](#)). *Zeb2* was also shown to be involved in type II epithelial cell differentiation ([Benlhabib et al., 2015](#)). Therefore, up-regulation of *Zeb2* by androgens may impact these mechanisms.

Some miRNAs modulated by flutamide in our study have also been shown to be regulated by hyperoxia, which is a model of bronchopulmonary dysplasia ([Dong et al., 2012](#); [Zhang et al., 2011](#)). Let-7f-2-3p (GD 17.0), miR-30e (GD 18.0) and miR-709 (GD 18.0) were up-regulated by flutamide in our experiment, whereas they were up-regulated by hyperoxia during the postnatal period ([Dong et al., 2012](#); [Zhang et al., 2011](#)). In contrast, miR-146b was up-regulated by flutamide but down-regulated by hyperoxia ([Dong et al., 2012](#)). Knowing that a sex difference was reported in the incidence of BPD ([Binet et al., 2012](#); [Choi et al., 2005](#); [Farstad et al., 2011](#)) and that this sex difference may originate from androgens, it would be interesting to test whether the miRNAs regulated by androgens at ages cited above are involved in the sex difference observed in BPD.

### **III-5 Conclusions**

The levels of several miRNAs are modulated by androgens in the developing lung on GD 17.0 and 18.0, thus during the transition from the canalicular to the saccular stage. Comparison with data from our previous study on the effect of the antiandrogen flutamide on the genomics of the developing lung allowed pairing of several androgen-regulated miRNAs with their androgen-regulated putative target(s). Putative miRNA-target genes belonged to several biological processes and functions important for lung development.

#### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests

#### **Authors' contributions**

Conceived and designed the experiments: WB PRP YT. Performed the experiments: WB. Analyzed the data: WB PRP YT. Wrote the paper: WB PRP YT.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Number 171140-2010 to YT. We acknowledge CHIR-Quebec Training Network in Perinatal Research and CIHR Quebec Respiratory Health Training Program for studentships to WB. We thank Mélanie Hamel-Auger for her technical assistance. We thank Dr Manon Richard for critical reading of the manuscript.

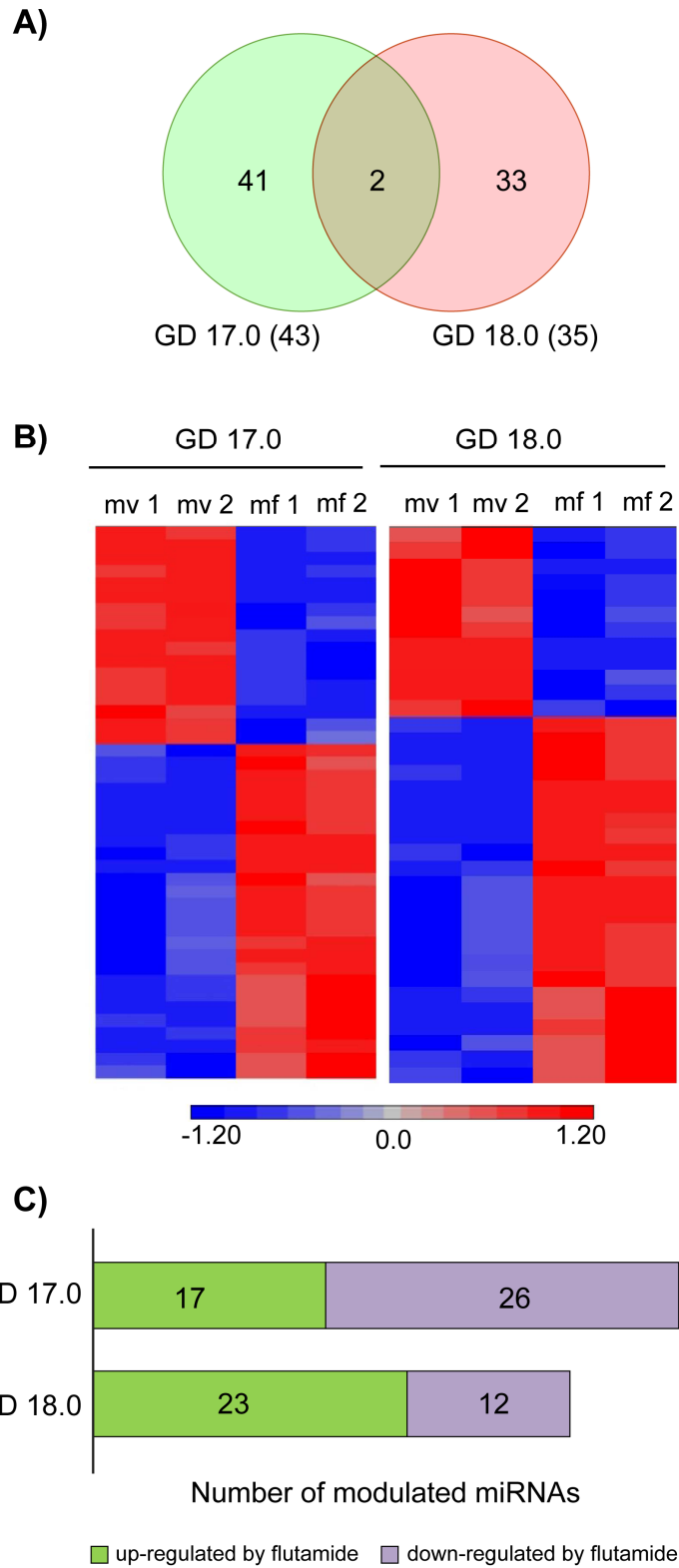
### III-6 Legends to figures

**Figure 10: Overview of the microarray data obtained from fetal mouse lungs exposed or not to flutamide. A** Number of androgen regulated miRNAs on GD 17.0 and GD 18.0. **B** Expression profile of differentially expressed miRNAs is presented for each replica and each gestation time. Red and blue indicate the intensity level above and below the median, respectively, for each miRNA and each replicate. For each age, results are given for the two replicates (1, 2) for male exposed to vehicle (mv) and male exposed to flutamide (mf). **C** Number of androgen-modulated mature miRNA according to their reactivity to flutamide at GD 17.0 and GD 18.0.

**Figure 11: Validation of microarray data by qPCR for several miRNAs. A)** Selection of reference genes by geNorm among the five tested candidates. The average of expression stability M is presented for each tested reference gene candidate (left panel). The two most stable genes yielded the lower pairwise variation value (0.179) (right panel). Quantification of several miRNAs by qPCR on GD 17.0 (**B**) and GD 18.0 (**C**). **D** Comparison of expression ratios (flutamide/vehicle) obtained by microarray and qPCR for 7 miRNA genes.

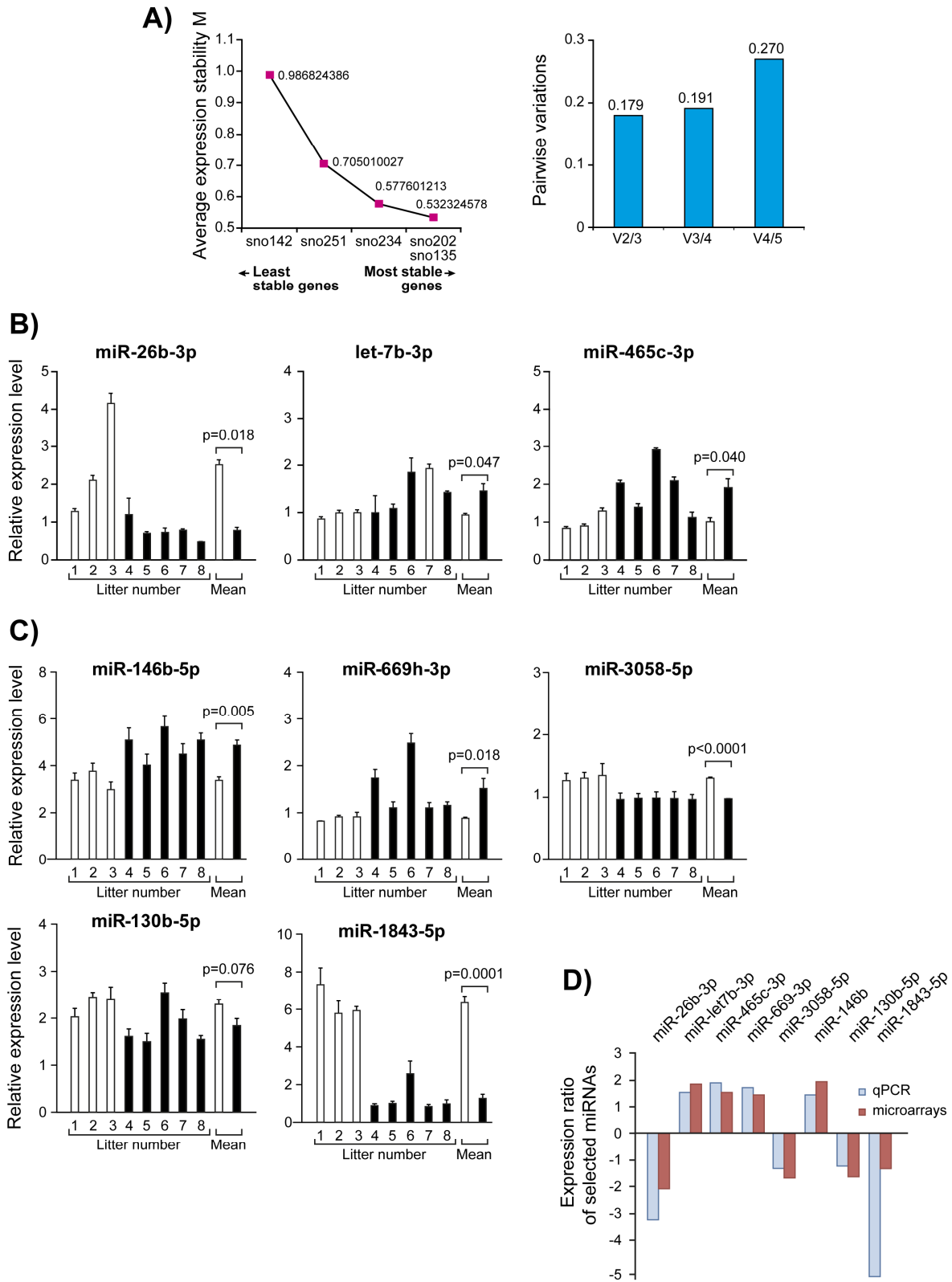
**Figure 12: Number of androgen-regulated miRNAs and their potential androgen-regulated targets according to biological processes on GD 17.0 (A) and GD 18.0 (B).**

**Figure 13: Number of androgen-regulated miRNAs and their potential androgen-regulated targets according to molecular functions on GD 17.0 (A) and GD 18.0 (B).**

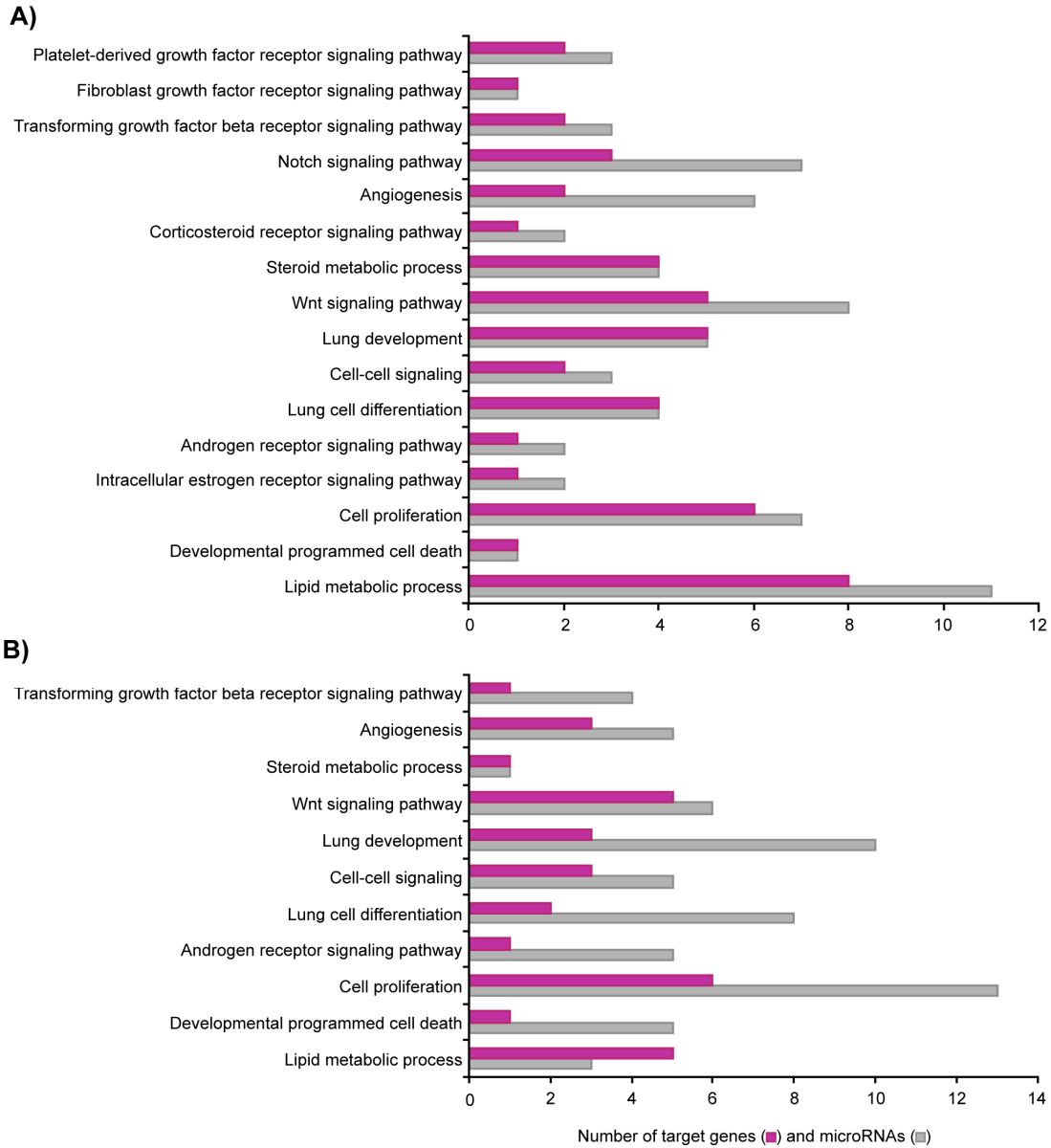


**Figure 10:** Overview of the microarray data obtained from fetal mouse lungs exposed or not to flutamide.

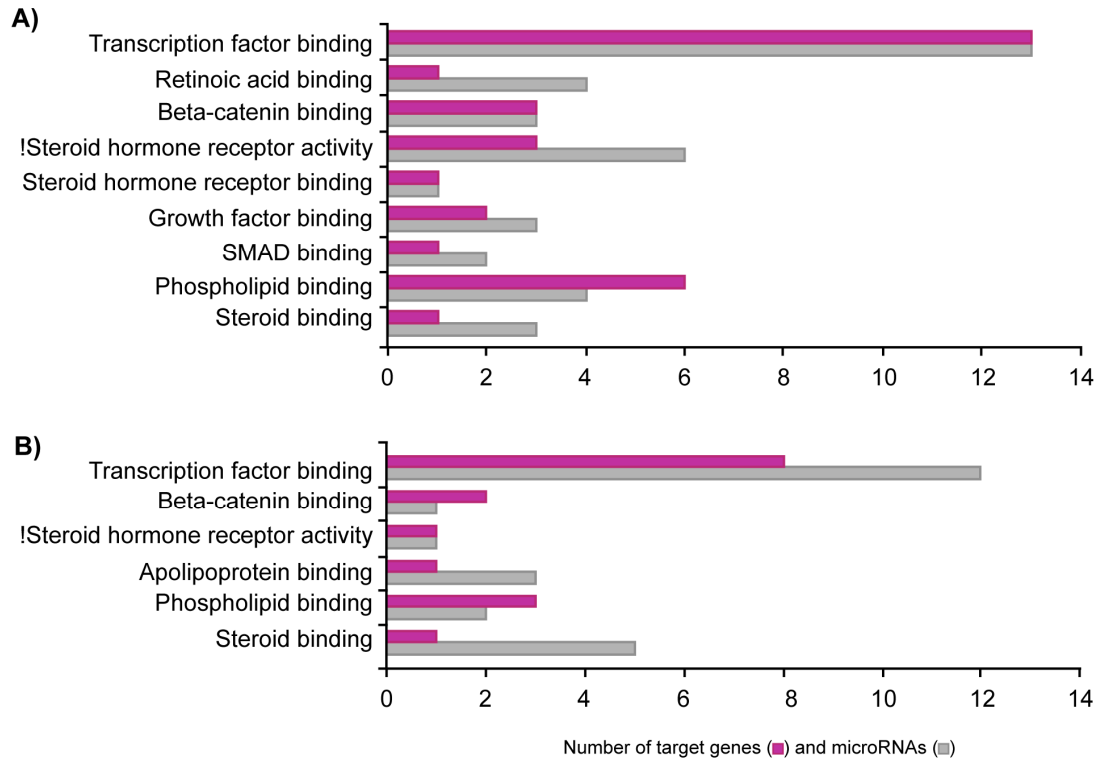




**Figure 11:** Validation of microarray data by qPCR for several miRNAs.



**Figure 12:** Number of androgen-regulated miRNAs and their potential androgen-regulated targets according to biological processes on GD 17.0 (A) and GD 18.0



**Figure 13:** Number of androgen-regulated miRNAs and their potential androgen-regulated targets according to molecular functions on GD 17.0 (A) and GD 18.0 (B).

**Table 5:** Androgen-regulated miRNAs and their corresponding mRNA target(s) on GD 17.0 classified according to several biological processes

Biological process	Gestational day 17.0 <sup>a</sup>		
	miRNA	mRNA target	
Lipid metabolic process	mmu-miR-3078	Etnk1; Pafah1b2	
	mmu-miR-877	Elovl4; Etnk1	
	mmu-miR-449a	Pdgfra	
	mmu-miR-1955-5p	Hdlbp; Pik3r1	
	mmu-miR-126-5p	Pbx1	
	mmu-miR-362-3p	Pbx1	
	mmu-miR-3470b	Smg1	
	mmu-let-7f-2-3p	Col4a3bp; Etnk1	
	mmu-let-7b-3p	Col4a3bp	
	mmu-miR-1249-5p	Smg1	
	mmu-miR-92a-1-5p	Hdlbp	
	Developmental programmed cell death	mmu-miR-449a	Slc4a7
	Cell proliferation	mmu-miR-1306-5p	Zeb2
mmu-miR-1955-5p		Gng2	
mmu-miR-215		Igf1; Zeb2	
mmu-miR-126-5p		Mmp16; Igf1; Yap1	
mmu-let-7f-2-3p		Col4a3bp	
mmu-let-7b-3p		Col4a3bp	
mmu-miR-674-3p		Mmp16	

Intracellular estrogen receptor signaling pathway	mmu-miR-126-5p	Arid1a
	mmu-miR-3103-5p	Arid1a
Androgen receptor signaling pathway	mmu-miR-126-5p	Arid1a
	mmu-miR-3103-5p	Arid1a
Lung cell differentiation	mmu-miR-3078	Creb1
	mmu-miR-126-5p	Igf1
	mmu-miR-215	Igf2
	mmu-miR-687	Nfib
Cell-cell signaling	mmu-miR-3078	Gabra1; Gja1
	mmu-miR-1306-5p	Gja1
	mmu-let-7f-2-3p	Gabra1
Lung development	mmu-miR-126-5p	Igf1
	mmu-miR-215	Igf1
	mmu-miR-687	Nfib
	mmu-miR-449a	Pdgfra
	mmu-miR-3078	Zfpm2; Creb1
Wnt signaling pathway	mmu-miR-687	Apc
	mmu-miR-3089-3p	Tnks2
	mmu-miR-1843-5p	Sfrp1
	mmu-miR-449a	Tbl1xr1
	mmu-miR-3078	Tle4
	mmu-miR-1195	Tnks2
	mmu-miR-1249-5p	Sfrp1
	mmu-let-7b-3p	Tle4
Steroid metabolic process	mmu-miR-1955-5p	Hdlbp

	mmu-miR-126-5p	Pbx1
	mmu-miR-449a	Pdgfra
	mmu-miR-92a-1-5p	Hdlbp
Corticosteroid receptor signaling pathway	mmu-miR-126-5p	Arid1a
	mmu-miR-3103-5p	Arid1a
Angiogenesis	mmu-miR-362-3p	Naa15
	mmu-miR-467h	Map3k7
	mmu-miR-669i	Map3k7
	mmu-miR-1955-5p	Naa15
	mmu-miR-3078	Naa15
	mmu-miR-687	Naa15
Notch signaling pathway	mmu-miR-687	Adam10
	mmu-miR-3078	Adam17
	mmu-miR-3089-3p	Adam17
	mmu-miR-362-3p	Adam17
	mmu-miR-126-5p	Jag1
	mmu-miR-449a	Jag1
	mmu-let-7b-3p	Jag1
Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	mmu-miR-3078	Creb1
	mmu-miR-467h	Map3k7
	mmu-miR-669i	Map3k7
Fibroblast growth factor receptor signaling pathway	mmu-miR-149	Ndst1
Platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	mmu-miR-449a	Pdgfra

mmu-miR-3089-3p	Zfand5
mmu-miR-126-5p	Zfand5

---

<sup>a</sup>Blue, up-regulated by flutamide; red, down-regulated by flutamide

**Table 6:** Androgen-regulated miRNAs and their corresponding mRNA target(s) on GD 17.0 classified according to molecular functions

Molecular function	Gestational day 17.0 <sup>a</sup>	
	miRNA	mRNA target
Steroid binding	mmu-miR-126-5p	Igf1
	mmu-miR-215	Igf1
Phospholipid binding	mmu-miR-126-5p	Ogt; Pitpnb
	mmu-miR-291a-3p	Wdr45
	mmu-let-7f-2-3p	Col4a3bp
	mmu-let-7b-3p	Pik3c2a; Sbf2; Col4a3bp
SMAD binding	mmu-miR-1306-5p	Zeb2
	mmu-miR-215	Zeb2
Growth factor binding	mmu-miR-215	Col5a1
	mmu-miR-449a	Pdgfra
	mmu-miR-1249-5p	Col5a1
Steroid hormone receptor binding	mmu-miR-1955-5p	Pik3r1
Steroid hormone receptor activity	mmu-miR-291a-3p	Nr2f2
	mmu-miR-362-3p	Nr2c2
	mmu-miR-467b	Nr2f2
	mmu-miR-467d	Nr2f2
	mmu-miR-467h	Nr2f2
	mmu-miR-432	Rorb
Beta-catenin binding	mmu-miR-687	Apc



	mmu-miR-449a	Tbl1xr1
	mmu-let-7f-2-3p	Cd2ap
Retinoic acid binding	mmu-miR-291a-3p	Nr2f2
	mmu-miR-467b	Nr2f2
	mmu-miR-467d	Nr2f2
	mmu-miR-467h	Nr2f2
Transcription factor binding	mmu-miR-3078	Creb1; Tle4; Meis2; Ddx3x
	mmu-miR-465c-3p	Ddx3x
	mmu-miR-291a-3p	E2f2
	mmu-miR-467b	E2f2
	mmu-miR-467d	E2f2
	mmu-miR-467h	E2f2
	mmu-miR-212-3p	Foxo3
	mmu-miR-362-3p	Kdm5c; Trip12
	mmu-miR-432	Kdm5c; Rorb
	mmu-miR-1195	Meis2
	mmu-miR-126-5p	Nfya; Zeb1; Ppargc1a;
		Pbx1
	mmu-miR-687	Nfya
	mmu-let-7b-3p	Tle4

---

<sup>a</sup>Blue, up-regulated by flutamide; red, down-regulated by flutamide

**Table 7:** Androgen-regulated miRNAs and their corresponding mRNA target(s) on GD 18.0 classified according to several biological processes

Biological process	Gestational day 18.0 <sup>a</sup>	
	miRNA	mRNA target
Lipid metabolic process	mmu-miR-30e	B3gnt5; St8sia4; Nr5a2; Myo5a
	mmu-miR-146b	Myo5a
	mmu-miR-361-3p	Smg1
Developmental programmed cell death	mmu-miR-30e	Bcl2
	mmu-miR-202-5p	Bcl2
	mmu-miR-3058	Bcl2
	mmu-miR-669h-3p	Bcl2
	mmu-miR-703	Bcl2
Cell proliferation	mmu-miR-130a	Appl1; Zeb2
	mmu-miR-146b	Appl1
	mmu-miR-452-3p	Appl1
	mmu-miR-202-5p	Bcl2
	mmu-miR-3058	Bcl2
	mmu-miR-703	Bcl2
	mmu-miR-3473d	Bcl2l2
	mmu-miR-669h-3p	Hdgfrp3; Bcl2
	mmu-miR-1251	Igf1
	mmu-miR-344f-3p	Igf1
mmu-miR-709	Myc; Igf1	

	mmu-miR-466l-5p	Igf1
	mmu-miR-30e	Igf1; Bcl2; Zeb2
Androgen receptor signaling pathway	mmu-miR-146b	Med13
	mmu-miR-3473d	Med13
	mmu-miR-669h-3p	Med13
	mmu-miR-703	Med13
	mmu-miR-883a-3p	Med13
Lung cell differentiation	mmu-miR-1251	Igf1
	mmu-miR-30e	Igf1
	mmu-miR-344f-3p	Igf1; Creb1
	mmu-miR-466l-5p	Creb1; Igf1
	mmu-miR-709	Igf1
	mmu-miR-130a	Creb1
	mmu-miR-202-5p	Creb1
	mmu-miR-703	Creb1
Cell-cell signaling	mmu-miR-883a-3p	Gls
	mmu-miR-130a	Lrp6
	mmu-miR-709	Lrp6
	mmu-miR-30e	Myo5a; Lrp6
	mmu-miR-146b	Myo5a
Lung development	mmu-miR-344f-3p	Igf1; Creb1
	mmu-miR-466l-5p	Igf1
	mmu-miR-202-5p	Creb1
	mmu-miR-703	Creb1
	mmu-miR-130a	Creb1

	mmu-miR-1251	Foxp2; Igf1
	mmu-miR-3058	Igf1; Foxp2
	mmu-miR-490-5p	Foxp2; Igf1
	mmu-miR-709	Foxp2; Igf1
	mmu-miR-669h-3p	Foxp2; Igf1
	mmu-miR-30e	Igf1
Wnt signaling pathway	mmu-miR-669h-3p	Apc
	mmu-miR-130a	Lrp6
	mmu-miR-30e	Lrp6
	mmu-miR-709	Myc; Lrp6
	mmu-miR-105	Usp34
	mmu-miR-669b-3p	Mitf
Steroid metabolic process	mmu-miR-30e	Nr5a2
Angiogenesis	mmu-miR-30e	Pdcd10
	mmu-miR-202-5p	Naa15
	mmu-miR-3085-5p	Naa15
	mmu-miR-883a-3p	Naa15
	mmu-miR-669h-3p	Srpk2
Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	mmu-miR-130a	Creb1
	mmu-miR-202-5p	Creb1
	mmu-miR-344f-3p	Creb1
	mmu-miR-703	Creb1

---

<sup>a</sup>Blue, up-regulated by flutamide; red, down-regulated by flutamide

**Table 8:** Androgen-regulated miRNAs and their corresponding mRNA target(s) on GD 18.0 classified according to several molecular functions

Molecular function	Gestational day 18.0 <sup>a</sup>	
	miRNA	mRNA target
Steroid binding	mmu-miR-1251	Igf1
	mmu-miR-30e	Igf1
	mmu-miR-344f-3p	Igf1
	mmu-miR-466l-5p	Igf1
	mmu-miR-709	Igf1
Phospholipid binding	mmu-miR-130a	Ccdc88a
	mmu-miR-30e	Eea1; Nr5a2
Apolipoprotein binding	mmu-miR-130a	Lrp6
	mmu-miR-30e	Lrp6
	mmu-miR-709	Lrp6
Steroid hormone receptor activity	mmu-miR-30e	Nr5a2
Beta-catenin binding	mmu-miR-669h-3p	Apc
	mmu-miR-669h-3p	Cd2ap
SMAD binding	mmu-miR-30e	Zeb2
	mmu-miR-130a	Zeb2
	mmu-miR-666-5p	Zeb2
Transcription factor binding	mmu-miR-202-5p	Bcl2; Creb1
	mmu-miR-30e	Bcl2
	mmu-miR-703	Bcl2; Med13; Creb1

mmu-miR-130a	Bptf; Tcf4; Rbbp8; Creb1
mmu-miR-3473d	Bptf; Med13
mmu-miR-466l-5p	Bptf; Tcf4
mmu-miR-709	Tcf4; Myc
mmu-miR-344f-3p	Creb1
mmu-miR-669h-3p	Bcl2; Nfyb; Med13
mmu-miR-883a-3p	Med13
mmu-miR-146b	Med13
mmu-miR-452-3p	Tcf4

---

<sup>a</sup>Blue, up-regulated by flutamide; red, down-regulated by flutamide

**Table S1:** List of primers used for reverse transcription and qPCR for selected miRNA genes

<b>Gene</b>	<b>Accession number</b>	<b>Reverse transcription primer/ qPCR forward primer<sup>c</sup> (5'-3')</b>
mmu-miR-26b-3p	MIMAT0004630 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGAGCCA GCGGCGGCCTGTTCTCCATTACT
mmu-let-7b-3p	MIMAT0004621 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGGGAAG GCGGCGGCTATACAACCTACTGC
mmu-miR-465c-3p	MIMAT0004874 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCTACT GCGGCGGGATCAGGGCCTTTCTA
mmu-miR-146b-5p	MIMAT0003475 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAGCCTA GCGGCGGTGAGAACTGAATTCCA
mmu-miR-669h-3p	MIMAT0005842 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTGTGCA GCGGCGGTATGCATATACACACA
mmu-miR-3058-5p	MIMAT0014813 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCTTCC GCGGCGGTCAGCCACGGCTTACCT
mmu-miR-130b-5p	MIMAT0004583 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAGTAGT GCGGCGGACTCTTTCCCTGTTGC
mmu-miR-485-3p	MIMAT0003129 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGAGAGG GCGCGCGAGTCATACACGGCTCT
mmu-miR-711	MIMAT0003501 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTTACA GCGGCGGGGACCCGGGGAGAGA
mmu-miR-3962	MIMAT0019340 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAAATGT GCGGCGGAGGTAGTAGTTTGT
mmu-miR-3067-3p	MIMAT0014841 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCCTCTC GCGGCGGCAAGCGGCTGCCCTGG

mmu-miR-212-3p	MIMAT0000659 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTGGCCG GCGGCGGTAACAGTCTCCAGTCA
mmu-miR-669i	MIMAT0005840 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGTATGC GCGGCGGTGCATATACACACAT
mmu-miR-877	MIMAT0004861 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCCCTGC GCGGCGGGTAGAGGAGATGGC
mmu-miR-3473d	MIMAT0020632 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAAGGGC GCGGCGGCCACTGAGCCACTTTCCA
mmu-miR-132-5p	MIMAT0016984 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGTAAACA GCGGCGGAACCGTGGCTTTTCGAT
mmu-miR-3074-1-3p	MIMAT0014857 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCGGTGC GCGGCGGGATATCAGCTCAGTAG
mmu-miR-128-2-5p	MIMAT0017069 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCTCTT GCGGCGGGGGGGCCGATGCACTGT
mmu-miR-130b-5p	MIMAT0004583 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACAGTAGT GCGGCGGACTCTTTCCCTGTTGC
mmu-miR-490-5p	MIMAT0017261 <sup>a</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACACCCAC GCGGCGGCCATGGATCTCCAG
sno-202	AF357327 <sup>b</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCATCAG GCGGCGGGCTGTACTIONACTTGA
sno-142	AF357324 <sup>b</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCCTC GCGGCGGGTCAGTGCCACGTGT
sno-135	AF357323 <sup>b</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTTCAG GCGGCGGCTAAAATAGCTGGAA
sno-251	AF357332 <sup>b</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTGGCT GCGGCGGATACATACTTGCCCT
sno-234	AF357329 <sup>b</sup>	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACCTCTCAG GCGGCGGCTTTTGGAACTGAAT



<sup>a</sup> : miRBase accession number

<sup>b</sup> : NCBI accession number

<sup>c</sup> :The universal reverse primer for qPCR is the same for all the genes: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'



**Chapitre IV: l'expression et la localisation de CYP21A2 dans l'épithélium pulmonaire humain fœtal est compatible avec une production in situ et une action intracrine de glucocorticoïdes actifs.**

Cet article est publié dans le journal *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* ([Bouhaddioui et al., 2016a](#)) sous le titre:

*«CYP21A2 expression is localized in the developing distal epithelium of the human perinatal lung and is compatible with in situ production and intracrine actions of active glucocorticoids »*

## Résumé en français de l'étude

Les glucocorticoïdes sont essentiels au développement pulmonaire. Nous avons étudié l'expression du gène *CYP21A2* (21-hydroxylase) et sa protéine correspondante. Également, nous avons identifié les cellules exprimant *CYP21A2* dans plusieurs tissus pulmonaires humains en développement. L'expression de certains gènes liés à la synthèse des glucocorticoïdes a également été étudiée. Les ARNm de *CYP21A2* et *CYP17A1* (P450c17) ont été détectés, à des niveaux variables, dans les 34 tissus pulmonaires fœtaux dont les âges varient de 17 à 40 semaines de grossesse. Aucune corrélation avec le sexe n'a été observée, mais une corrélation avec l'âge gestationnel a été détectée pour *CYP17A1* seulement. En revanche, les ARNm de *CYP11B1* (11 $\beta$ -hydroxylase) et *CYP11B2* (aldostérone synthase) n'ont pas été détectés. Des niveaux importants de la protéine *CYP21A2* ont été détectés dans tous les échantillons analysés, tandis que des signaux très faibles ont été détectés pour la protéine *CYP17A1*. L'hybridation in situ a révélé que *CYP21A2* est exprimé presque exclusivement dans l'épithélium distal. Il a été rapporté que l'enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2, qui catalyse l'inactivation du cortisol en cortisone, est exprimée dans l'épithélium distal de poumons humains fœtaux. Sur la base de ces informations, les actions intracrines des glucocorticoïdes devraient avoir lieu à partir des produits de *CYP21A2* via l'activation du récepteur des glucocorticoïdes en l'absence du cortisol. L'activation du récepteur des minéralocorticoïdes ne semble pas dépendre de la désoxycorticostérone produite à partir de l'activité locale de *CYP21A2* en raison des niveaux d'aldostérone circulants suffisants pour activer le récepteur.

**CYP21A2 expression is localized in the developing distal epithelium of the human perinatal lung and is compatible with *in situ* production and intracrine actions of active glucocorticoids**

Wafae Bouhaddioui<sup>1,3</sup>, Pierre R. Provost<sup>1,2,3</sup> and Yves Tremblay<sup>\*1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Reproduction, Mother and Youth Health, Centre de recherche CHU de Québec, Québec, QC, Canada

<sup>2</sup> Department of Obstetrics/Gynecology & Reproduction, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

<sup>3</sup>Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction (CRBR), Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada

**Corresponding author/to whom reprint requests should be addressed:**

Yves Tremblay, Ph.D.

Department of Obstetrics/Gynecology & Reproduction

Reproduction, Mother and Youth Health, Centre de recherche du CHU de Québec

2705 Laurier Boulevard, Rm T-3-67, Québec, QC, Canada, G1V 4G2

Phone : 1-418-525-4444 #46158; Fax: 1-418-654-2783, E-mail:

[yves.tremblay@crchudequebec.ulaval.ca](mailto:yves.tremblay@crchudequebec.ulaval.ca)

## Abstract

Glucocorticoids play essential roles in lung development. We investigated for expression of *CYP21A2* (21-hydroxylase) as well as for the presence of the corresponding protein and identification of *CYP21A2*-expressing cells in several human developing lungs. Expression of some related genes was also assessed. *CYP21A2* and *CYP17A1* (P450c17) mRNAs were found in all the 34 lung samples from 17 to 40 weeks' gestation at variable levels. No correlation was found according to sex but a correlation with age was detected for *CYP17A1* only. In contrast, *CYP11B1* (11 $\beta$ -hydroxylase)- and *CYP11B2* (aldosterone synthase)-mRNAs were not detected. Significant levels of the *CYP21A2* protein were detected in all the analyzed samples, while only very low signals were detected for *CYP17A1* protein. *In situ* hybridization revealed that *CYP21A2* was almost exclusively expressed in the distal epithelium. It was reported that the lung distal epithelium of human fetuses also express 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, which catalyzes cortisol inactivation into cortisone. Based on this information, intracrine glucocorticoid actions should take place from *CYP21A2* products through the glucocorticoid receptor in the absence of cortisol. In contrast, mineralocorticoid receptor activation did not seem to depend on deoxycorticosterone produced from local activity of *CYP21A2* because of the reported circulating amounts of aldosterone.

**Keywords:** 11-deoxycortisol; 21-hydroxylase; deoxycorticosterone; glucocorticoids; lung development; mineralocorticoids; respiratory distress syndrome

## IV-1 Introduction

Glucocorticoids (GCs) are principally secreted by the adrenal cortex. GCs play important roles in several physiological processes including lung development. The first evidence of GC benefit on lung maturation was established by Liggins in 1968 ([Liggins, 1968](#)). Acceleration of lung maturation was observed in preterm lambs after antenatal GC therapy. This important role was confirmed with a glucocorticoid receptor (GR) knockout mouse model, which showed an altered respiratory system leading to newborn death ([Cole et al., 1995](#)). GCs are known to play a positive role in fibroblast-epithelial cell-cell communication by increasing the secretion of fibroblast factors leading to the surge of surfactant synthesis ([Dammann et al., 2003](#); [Floros et al., 1985](#); [Provost et al., 2013](#)). GCs also have other effects on the developing lung including a decrease in alveolar wall thickness ([Bolt et al., 2001](#)). For several decades, antenatal GCs have been administered to mothers at risk for premature delivery to accelerate fetal lung maturation and prevent respiratory distress syndrome (RDS) of neonates ([Carlo et al., 2011](#); [McKinlay et al., 2012](#)). RDS is the first cause of early neonatal death affecting 20% of neonates weighting less than 2500 g and two thirds of babies of less than 1500 g ([Roberts and Dalziel, 2006](#)).

In addition to GR, mineralocorticoid receptor (MR) is also expressed in the developing lung ([Hirasawa et al., 1999](#)). In contrast to GR gene disruption, MR gene disruption did not induced any obvious morphological change in the neonatal lung ([Berger et al., 1998](#)). In addition, MR-KO mice did not die from a respiratory failure, but rather from a failure of sodium reabsorption between day 8 and 13 ([Hubert et al., 1999](#)). While  $\alpha$ -ENaC is known to be involved in lung liquid resorption at birth ([Hummler et al., 1996](#)) and MR is known for its role in the induction of ENaC in the kidney ([Chen et al., 1999](#); [Pearce et al., 2000](#)), it was demonstrated that, in the fetal lung, ENaC was modulated by glucocorticoids through GR rather than by mineralocorticoids through MR ([McCartney et al., 2014](#); [Venkatesh and Katzberg, 1997](#)). Aldosterone was associated with the control of

cell proliferation in the developing lung ([McCartney et al., 2014](#)).

In addition to blood stream contribution to GCs levels in the lung, local synthesis of GCs can also be observed. Peripheral GC synthesis is generally associated with type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) (Fig. 14) ([Garbrecht et al., 2006](#); [Provost et al., 2013](#)). This enzyme is expressed in the rodent developing lung and its knockout has been shown to impair lung maturation ([Hundertmark et al., 2002](#)). Emerging evidences from the mouse indicate that active GC should also be produced through the expression of “adrenal” enzymes within the developing lung. Since more than a decade, we know that genes encoding for enzymes involved in GC synthesis in adrenals are expressed in some extra-adrenal tissues such as the thymus ([Pazirandeh et al., 1999](#)) and skin ([Vukelic et al., 2011](#)). We have demonstrated that it is also the case for the fetal mouse lung ([Provost and Tremblay, 2005](#)). All the genes required for corticosterone synthesis are expressed in the fetal mouse lung on gestation day (GD) 15, near the end of the pseudoglandular stage: *Cyp11a1* (*P450scc*), *Hsd3b1* (3 $\beta$ -HSD), *Cyp21a1* (*P450c21* or 21-hydroxylase), and *Cyp11b1* (*P450c11 $\beta$*  or 11 $\beta$ -hydroxylase) (Fig. 14) ([Provost and Tremblay, 2005](#)). From GD 17.5 to postnatal day 15.0, all these genes, but *Cyp11b1*, are expressed ([Boucher et al., 2014](#)). This is interesting knowing that deoxycorticosterone is an agonist of GR ([Hellal-Levy et al., 1999](#); [Lu et al., 2006](#); [Medh et al., 1998](#); [Rupprecht et al., 1993](#)) and MR ([Bureik et al., 2005](#); [Lu et al., 2006](#); [Rupprecht et al., 1993](#)). *Cyp11b2* (*P450c11AS* or aldosterone synthase) and *Cyp17a1* (*P450c17*) are either not expressed or expressed at very low levels in the tested mouse fetal lung samples ([Provost and Tremblay, 2005](#)). *In vitro* activity assays with fetal mouse lung explants showed synthesis of deoxycorticosterone and corticosterone in specific conditions ([Boucher et al., 2015](#)), while aldosterone synthesis was never observed.

There is a difference between human and rodent adrenal GC synthesis pathways. This difference relies to the expression of *CYP17A1* which is found in the human adrenal but not in the rodent adrenal (Fig. 14). As a consequence, the



active GC synthesized by *CYP11B1* and secreted in the blood by adrenals is cortisol in human and corticosterone in rodents ([Schiffer et al., 2015](#)). Whether the “adrenal” pathway of GC synthesis also exists in the human fetal lung remains to be demonstrated. The products of *CYP21A2* (21-hydroxylase in the human) can be transformed into a GC or a mineralocorticoid (aldosterone) depending on the expression of *CYP11B1* and *CYP11B2* in the fetal lung. In the present study, we investigated the expression of *CYP21A2*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, and *CYP17A1* in order to characterize the capability of the human fetal lung to produce GC/mineralocorticoid through the “adrenal” steroidogenic pathway. In addition, cell specificity of *CYP21A2* gene was determined by *in situ* hybridization.

## **IV-2 Materials and Methods**

### **IV-2-1 Human tissues**

Human fetal lung samples from 17 to 24 67 weeks of pregnancy (n = 29, 12 females and 17 males) were obtained from women who gave birth prematurely or were undergoing termination of pregnancy from the same obstetrics unit. The mothers completed a consent form before participating in the project (protocol no. 62-05-13). Two exclusion factors were taken into account: mothers’ antenatal glucocorticoid treatment and malformations/diseases affecting the developing respiratory system. Tissues were collected on ice and extensively rinsed in PBS (135 mM NaCl, 2.65 mM KCl, 4.22 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.45 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Then, tissues were either frozen at -80°C for RNA or protein extraction, or fixed during 48 hours in 4% paraformaldehyde in PBS before paraffin embedding. Human fetal lung RNA samples from 29 to 40 weeks of pregnancy (n = 5, 2 females and 3 males) and human adult adrenal RNA sample (normal woman, 88 years-old) were purchased from BioChain® (Newark, Ca, USA). A fragment of human adult adrenal tissue obtained before 1999, before the establishment of the ethics committee of Université Laval, was used for microsome and total protein analyses. Another

adrenal total protein sample (from a 63 year old man) was obtained from BioChain®.

#### **IV-2-2 RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR**

Total RNA was extracted using Tri-reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), a mixture of phenol and guanidine thiocyanate in a monophasic solution, then purified on a CsCl gradient as previously described ([Provost et al., 2004](#)). RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. The O.D.260/280 ratio ranged between 1.8 and 2.0 for all the RNA samples.

Total RNA (4 µg) was treated with DNase I (0.25 U/µg of RNA), and reverse transcribed using Superscript II (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and hexameric random primers (pd[N]<sub>6</sub>, Life Technologies) in a final volume of 20 µl according to the manufacturer's protocol. Reverse transcriptase was inactivated by heating at 70°C for 15 min. The resulting cDNAs were diluted tenfold before qPCR analyses. Real-time qPCR was performed using LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kits (Roche Diagnostics) and a Light Cycler 1.5 Instrument (Roche Diagnostics) (all the genes but *CYP17A1*), or using FastStart Essential DNA Green qPCR Master Mix kits and a LC96 Instrument (Roche Diagnostics). Reactions were performed according to the manufacturer's instructions with an amount of cDNA corresponding to 100 ng of total RNA input, 0.5 µM of each specific primer, and 3 mM MgCl<sub>2</sub> in a final volume of 20 µl. Samples were incubated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 5 sec, annealing temperature for 5 sec, 72°C for 20 sec, and temperature of fluorescence intensity reading for 5 sec. Specific primers and qPCR conditions are presented in Table 9. At the end of each run, samples were heated to 95°C with a temperature transition rate of 0.2°C/sec to construct dissociation curves. The external standard normalization method was used and standard curves were prepared as previously described ([Simard et al., 2007](#)). The TATA box binding protein (TBP) and succinate dehydrogenase

complex, subunit A, flavoprotein (SDHA) were chosen as normalisation genes. The suitability of these normalisation genes for the study of human fetal lung samples had previously been determined ([Simard et al., 2010](#)). The amount of mRNA molecules per 100 ng total RNA input was estimated from the amount of specific cDNA template (nanograms) obtained by real-time PCR and the molecular weight of each double-stranded specific cDNA sequence. The amounts of mRNA molecules reported herein are not normalized for the efficiency of reverse transcriptase reactions.

#### **IV-2-3 RNA probe synthesis and in situ hybridization**

An amplicon of human *CYP21A2* corresponding to nucleotides 736 to 902 of the mRNA sequence (#accession NM\_000500.7) was obtained using primers 5'-GGGTCTAGATGGACGTGATTCCCTTTCTC-3' and 5'-GGGAAGCTTCACCCCTTGGAGCATGTAGT-3', and was cloned into pGEM-3Zf(-) vector (Life Technologies Inc.). The DNA matrix for RNA probe synthesis was prepared by PCR using the resulting clone, primers encompassing the SP6 (5'-ATTAGGTGACACTATAGAATAC-3') and T7 (5'-TGTAATACGACTCACTATAGGG-3') promoters, an Expand Long Template PCR System kit (Roche Diagnostics), on a Bio-Rad T100 Thermal Cycler instrument. RNA probes were synthesized using DIG-UTP substrate (Roche Diagnostics) with 1µg DNA, 2µl of 10X transcription buffer (Roche Diagnostics), 2µl NTP labeling mix (Roche Diagnostics), 20 U RNase inhibitor (Promega), and 40 U T7 (sense) or SP6 (antisense) polymerase (Roche Diagnostics) in a final volume of 20µl. DNA matrix was digested with 20 U of DNase I (Roche Diagnostics). After precipitation, probes were quantified with a Nanodrop spectrophotometer and tested by gel electrophoresis. Tissue sections of 5 µm were deparaffinized, rehydrated, and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS for 5 min. Slides were then subjected to *in situ* hybridization as previously reported ([Simard et al., 2010](#)).

#### **IV-2-4 Protein extraction and Western blot analysis**

Total proteins were prepared as previously described ([Boucher et al., 2014](#)). Microsome extracts were prepared in ice-cold KPBS buffer containing 20% glycerol, 1.0 mM EDTA, and 4 mM potassium phosphate pH 7.0, as previously described ([Boucher et al., 2014](#)). At the end of the procedure, microsomes were resuspended in lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 8 mM sodium pyrophosphate, and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)). Protein concentrations were measured using a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) based on the Bradford's assay.

Total and microsomal proteins were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Mini-protean® TGX™ gels, Bio-RAD). Then, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-RAD). Membranes were blocked 2 hours at room temperature with 5% fat-free milk powder in PBS containing 0.1% Tween 20. Then membranes were incubated overnight at 4°C with either a polyclonal rabbit anti-human CYP21A2 antibody (1:750; ab64887, abcam®, Cambridge, MA, USA), a mouse anti-rat Cyp21a1 monoclonal antibody (1:3000; Chemicon International Inc., ON, Canada), or a polyclonal rabbit anti-human CYP17A1 antibody (1:1000; sc-66849, Santa Cruz Biotechnology Inc.) in PBS containing 0.1% Tween 20 and 2.5% fat-free milk. After washing in PBS-0.1% Tween 20, antibodies were visualized with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1/1000, Thermo Scientific, Rockland, IL, USA) or goat anti-mouse (1/5000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) antibodies using a SuperSignal™ West Femto Substrate kit and a ChemiDoc™ MP Imaging System.

## IV-2-5 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). For *CYP21A2*, the data did not assume a Gaussian distribution. Consequently, a Mann Withney test was used to compare groups (sex) and a Spearman correlation test was used to study the putative correlation between gene expression and age. For *CYP17A1*, a student-t test was used to compare groups (sex), while the putative correlation between gene expression and age was studied using a Pearson's correlation test. A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered to be significant.

## IV-3 Results

### IV-3-1 Analysis of *CYP21A2*, *CYP17A1*, *CYP11B1*, and *CYP11B2* gene expression in the human fetal lung

Relative *CYP21A2* mRNA levels were determined by qPCR in male and female human fetal lung samples from 17 to 40 weeks' gestation. A human adrenal tissue sample from an adult subject was included as positive control. Results are presented in Fig. 15A. *CYP21A2* expression was detected in all the analyzed samples at various levels. No statistically significant variation was found according to sex ( $p$ -value = 0.15) or age (all samples,  $r = -0.13$ ,  $p$ -value 0.44; male samples,  $r = -0.33$ ,  $p$ -value = 0.15; female samples,  $r = -0.02$ ,  $p$ -value = 0.93). The difference in expression levels between fetal lungs and adult adrenals was about 1400-fold in the favor of adrenals.

The same approach was used to study *CYP17A1* expression. *CYP17A1* mRNA was observed in all the analyzed samples with no sex difference ( $p$ -value = 0.72) (Fig. 15B). A statistically significant difference according to age was observed in the expression level ( $r = 0.39$ ,  $p$ -value = 0.02), but when male samples or female

samples were considered separately, no significant correlation was found (male samples,  $r = 0.37$ ,  $p$ -value = 0.11; female samples,  $r = 0.44$ ,  $p$ -value = 0.12). The relative levels of CYP17A1 mRNA were about 57,100-fold lower in the fetal lungs compared with adult adrenals.

The number of CYP21A2 mRNA molecules was on average of 700 molecules/100 ng of total RNA input in fetal lung samples and 180 000 molecules/100 ng of total RNA input in the adult adrenal RNA sample. For CYP17A1 mRNA, an average of 1800 and a value of  $14 \times 10^6$  molecules/100 ng of RNA input were obtained for fetal lungs and the adult adrenal RNA samples, respectively. Therefore, using this method the relative amounts of RNA molecules for the two genes were in the same range in fetal lungs, but not in adrenals where the amount of CYP17A1 mRNA exceeded that of CYP21A2 by 75-fold. This last observation is compatible with the fact that the mature adrenals produce high levels of dehydroepiandrosterone /-SO<sub>4</sub> ([Bélanger et al., 1994](#)).

Expression of *CYP11B1* and *CYP11B2* in fetal lung was also assessed. Messenger RNAs corresponding to these two genes were detected in the adult adrenal positive control, but undetectable in the 34 tested lung samples for which CYP21A2 mRNA was detected (data not shown).

#### **IV-3-2 Production of CYP21A2 and CYP17A1 proteins by human fetal lungs**

Levels of CYP21A2 protein were analyzed by Western blotting. Using microsome extracts, variable levels were observed from subject to subject (Fig. 16 A and 16B), as noted for CYP21A2 mRNA (Fig. 15). Two different antibodies against CYP21A2 were used to confirm the presence of the protein. The two antibodies yielded positive signals of 55 kDa in fetal lungs, such as for the adult adrenal control. The relative levels of CYP21 were also compared between total protein extracts prepared from fetal lung and adult adrenals (Fig. 16C). Our data show that CYP21

was less abundant in the developing lung than in the mature adrenals, but the level of CYP21 protein in the lung was important.

CYP17A1 protein was studied by Western blot. As shown in Fig. 16D, the antibody detected two bands with microsomal protein extracts of adult adrenals and fetal lungs. However, the major band was the lowest for the adrenals and the highest for the lungs. The lowest band was amplified in microsome-enriched preparation compared with total protein extract (Fig. 16E), and therefore corresponded to the microsomal CYP17A1. Only a very low signal was obtained for the microsomal CYP17A1 with lung microsome extracts (Fig. 16D), while no signal was observed with lung total protein extracts (data not shown).

### **IV-3-3 Localization of Cyp21A2 mRNA in human fetal lungs**

Localization of CYP21A2 mRNA in human fetal lungs was performed by *in situ* hybridization. As shown in Fig. 17, the major expression site is the epithelium of the respiratory zone (or distal epithelium). No change in the major site of expression was observed between sexes and according to gestational time (17 to 23 4/7 weeks' gestation). For one lung sample (Fig. 17C), a very low signal, close to the background, was observed in the mesenchyme. The epithelium of the conducting zone (proximal epithelium), arteries and veins were negative.

## **IV-4 Discussion**

GCs are essential to lung development as demonstrated by the GR null mice, that died of respiratory failure soon after birth ([Cole et al., 1995](#)). This is in line with the fact that GC antenatal therapy is used to accelerate lung maturation in order to reduce the incidence of RDS ([Carlo et al., 2011](#); [McKinlay et al., 2012](#)). This is the first study showing CYP21A2 mRNA localization and protein expression within the human developing lung. Our data are compatible with the finding of 21-hydroxylase

activity in human fetal lung in the 80s ([Casey et al., 1983](#)). Each of the two products of CYP21A2 is both a GR and a MR agonist. Indeed, deoxycorticosterone activates GR ([Hellal-Levy et al., 1999](#); [Lu et al., 2006](#); [Medh et al., 1998](#); [Rupprecht et al., 1993](#)) and MR ([Bureik et al., 2005](#); [Lu et al., 2006](#); [Rupprecht et al., 1993](#)), whereas 11-deoxycortisol is an agonist of GR ([Close et al., 2010](#); [Medh et al., 1998](#)) and MR ([Bureik et al., 2005](#); [Close et al., 2010](#)). We have also shown that *CYP11B1* and *CYP11B2* are not expressed in the human fetal lung. Consequently, the products of CYP21A2 are not transformed in classical GCs (corticosterone/cortisol) or mineralocorticoid (aldosterone). Nevertheless, we have also shown that *CYP21A2* is expressed in the region where GCs are required to stimulate lung maturation and other functions, and that CYP21A2 mRNA is translated. Taken together, our data are compatible with the existence of a developmental mechanism controlling lung maturation through expression of *CYP21A2* within the human developing lung.

The presence of CYP17A1 mRNA in the fetal lung suggests that 11-deoxycortisol may be synthesized. Because, the two products of 21-hydroxylase, deoxycorticosterone and 11-deoxycortisol, are both GR and MR agonists, the exact impact of *CYP17A1* expression in the fetal lung is unclear. CYP17A1 protein levels were very low, which also contributes to the confusion about the role of this enzyme in the developing lung.

In 2003, mRNAs of “adrenal” genes involved in GC and aldosterone synthesis were studied in several human fetal tissues including one pool of three lung fragments ([Pezzi et al., 2003](#)). In the human lung sample, CYP17A1- and CYP11B2-mRNAs were not detected whereas detectable levels of CYP11A1-, 3 $\beta$ -HSD-1-, CYP21A2- and CYP11B1-mRNAs were observed. In contrast to that study, CYP17A1 mRNA was detected in all the analyzed samples (Fig. 15B), although only very low levels of the microsomal CYP17A1 protein were detected (Fig. 16D). Also in contradiction with that study, CYP11B1-mRNA was not detected in any of the 34 human lung samples analyzed in the present study. In the study of



2003, the lung pool seemed to contain some tissue originating from the pseudoglandular stage which was not covered by the present study. CYP11B1 could be expressed during that period as it was demonstrated for the mouse ([Provost and Tremblay, 2005](#)).

More than one source of GCs is available to the developing lung. The blood stream is an important GC source. In contrast to rodent 11 $\beta$ -HSD-1, human 11 $\beta$ -HSD-1 does not seem to be an important source of active GCs in the developing lung ([Garbrecht et al., 2006](#); [Provost et al., 2013](#)). The other source is expression of *CYP21A2* leading to steroids with a GR agonist property. This source should be important based on the fact that the GR is not saturated in the developing lung, as shown by the positive effects of antenatal GC administration on lung maturation ([Carlo et al., 2011](#); [McKinlay et al., 2012](#)). In contrast to the endocrine function of adrenals requiring high expression levels of steroidogenic enzyme genes to reach significant levels in blood, intracrine actions of GCs are compatible with lower GC production levels within specific cells. GR activation in the GC-producing cell itself, which is an intracrine action, does not necessitate GC accumulation or a high production rate. The concept of intracrine action was first demonstrated for dihydrotestosterone formation in the prostate ([Labrie, 2015a, b](#)). After its production at relatively low rate by distal epithelial cells compared with adrenals, the GR agonist deoxycorticosterone should not be swamped by circulating cortisol since 11 $\beta$ -HSD-2 is also expressed in the distal epithelium in human developing lungs ([Garbrecht et al., 2007](#)). Indeed, while cortisol is inactivated into cortisone by 11 $\beta$ -HSD-2, *CYP21A2* produces deoxycorticosterone /11-deoxycortisol concomitantly in the same cells, making of deoxycorticosterone /11-deoxycortisol the main GR agonists (Fig. 18). This is compatible with the fact that GR is not saturated in the developing lung ([Carlo et al., 2011](#); [McKinlay et al., 2012](#)) and highlights the physiological relevance of putative intracrine actions. *HSD11B2* is rather known for its co-expression with MR where it avoids MR activation by cortisol, allowing aldosterone to bind MR as a specific ligand. Therefore, in the distal epithelium, *HSD11B2* would have two functions: 1) to ensure the specificity

of MR for mineralocorticoids (aldosterone, deoxycorticosterone, 11-deoxycortisol), and; 2) to ensure the specificity of GR for deoxycorticosterone /11-deoxycortisol.

Knowing that deoxycorticosterone and 11-deoxycortisol are both GR and MR agonists, what would be the purpose of *CYP21A2* expression in the developing lung? Aldosterone levels in the fetal blood are approximately 2.5-9.5 nM ([Baker et al., 2015](#)), which is sufficient for MR transactivation ([Hellal-Levy et al., 1999](#)). Fetal deoxycorticosterone levels were shown to increase during pregnancy ([Casey and MacDonald, 1982](#)). However, the maximum values ([Baker et al., 2015](#); [Brown et al., 1972](#)) are clearly below the minimum concentration to activate GR ([Hellal-Levy et al., 1999](#); [Medh et al., 1998](#)). The situation is the same for 11-deoxycortisol ([Medh et al., 1998](#); [Nahoul et al., 1988](#); [Sippell et al., 1981](#)). As a consequence, and based on the expression of *HSD11B2* by the distal epithelium, *CYP21A2* activity would be the only way to activate GR in these cells, but not MR because of circulating levels of aldosterone (Fig. 18).

GC intracrine actions in distal epithelial cells would include stimulation of surfactant protein levels which are already known to be stimulated by epithelial GR ([Manwani et al., 2010](#)). Other examples of possible intracrine actions in the epithelium are the stimulatory effect of GC on epithelial sodium channels (ENaC) ([Manwani et al., 2010](#)), a decrease of the mesenchymal compartment in favor of the alveolar area ([Habermehl et al., 2011](#)) and a decrease in cellularity ([Manwani et al., 2010](#)). The expression of *CYP21A2* in the distal epithelium is also compatible with a role for GCs in alveolarization. Indeed, in the mouse, an increase in *Cyp21A1* mRNA and protein levels was observed at the beginning of alveolarization ([Boucher et al., 2014](#)). Unfortunately, such an increase was not observed near term in humans and more samples are required to conclude whether such an increase exists in the human fetal lung.

In 1989, it was reported that *CYP21A2* mRNA was absent from the human fetal lung, more precisely that, if present, this messenger must accumulate at levels

lower than 1% of the adrenal CYP21A2 mRNA levels ([Mellon and Miller, 1989](#)). In support of those results, we have shown in this report using a more sensitive technique (qPCR) that human fetal lung CYP21A2 mRNA levels are around 0.1% the levels observed in one adult adrenal sample. *In situ* hybridization revealed that the *CYP21A2* gene expression is concentrated in the distal epithelium, which argues in the favor of an important impact on the developing lung. Two other human genes were proposed to encode for proteins exerting low 21-hydroxylase activities: *CYP2C19* and *CYP3A4* ([Gomes et al., 2009](#)). Their involvement in human fetal lung steroid metabolism remains to be studied.

## IV-5 Conclusions

Our findings demonstrate the expression of *CYP21A2* in the distal epithelium and the presence of significant levels of CYP21A2 protein in human fetal lungs. Very low levels of microsomal CYP17A1 protein were detected. The absence of *CYP11B1* and *CYP11B2* expression in human fetal lungs suggests that the products of CYP21A2 would bind to the GR and exert intracrine actions within the developing lung, which is compatible with relatively low expression levels for *CYP21A2* compared with adrenals. This is strongly supported by the reported co-expression of 11 $\beta$ -HSD-2 in the distal epithelium of human fetal lungs inactivating cortisol but not deoxycorticosterone or 11-deoxycortisol. Finally, the product of CYP21A2 would bind MR, like aldosterone from the circulation.

## IV-6 Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) no. MOP123232 to YT. We acknowledge CHIR-Quebec Training Network in Perinatal Research and CIHR Quebec Respiratory Health Training Program for studentships to WB. We thank Éline Gérard and Mélanie Hamel-Auger

for their technical assistance. We thank Dr Manon Richard for editing the manuscript.

## Figure Legends

**Figure 14:** Adrenal glucocorticoid and mineralocorticoid pathways. Human and rodent mineralocorticoid synthesis pathways (from cholesterol to aldosterone) and human glucocorticoid synthesis pathway (to cortisol through P450c17) are shown with plain arrows. Dotted arrows show the rodent adrenal glucocorticoid pathway (from cholesterol to corticosterone). The “classical” peripheral glucocorticoid metabolic reactions are presented in the box. The protein encoded by *P450c11AS* exerts 11 $\beta$ -hydroxylase, 18-hydroxylase, and 18-oxidase activities. *P450scc*: cytochrome P450 side chain cleavage (*CYP11A1* and *Cyp11a1* in human and mouse adrenals, respectively); *3 $\beta$ -HSD*: 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase (*CYP3B2* and *Cyp3b1* in human and mouse adrenals, respectively, and *Cyp3b1* in mouse lungs); *P450c21*: cytochrome P450 21-hydroxylase (*CYP21A2* and *Cyp21a1* in human and rodent adrenals, respectively); *P450c11 $\beta$* : cytochrome P450 11 $\beta$ -hydroxylase (*CYP11B1* and *Cyp11b1* in human and rodent adrenals, respectively); *P450c11AS*: cytochrome P450 aldosterone synthase (*CYP11B2* and *Cyp11b2* in human and rodent adrenals, respectively); *P450c17*: cytochrome P450c17 or steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase (*CYP17A1* and *Cyp17a1* in human and rodent adrenals, respectively); *11 $\beta$ -HSD-1* and *11 $\beta$ HSD-2*; type 1 and type 2 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases, *HSD11B1* and *HSD11B2*.

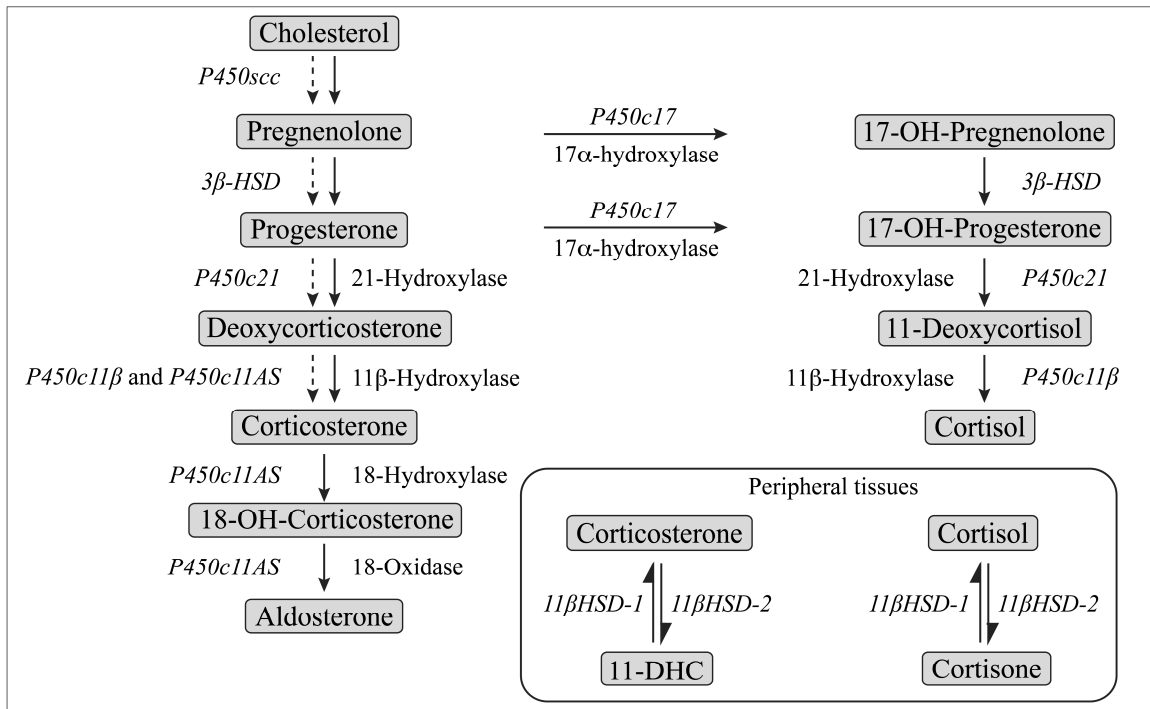
**Figure 15:** Expression of *CYP21A2* and *CYP17A1* in the human fetal lung. Relative expression values were determined by qPCR for *CYP21A2* (A) and *CYP17A1* (B) in the fetal human lung samples from 20 males and 14 females from 17 to 40 weeks' gestation. One human adult adrenal is included as positive control (solid bar). Values were normalized by geNorm normalization factors using SDHA and TBP as housekeeping genes.

**Figure 16:** CYP21A2 and CYP17A1 proteins in human fetal lungs. Western blot analyses of CYP21A2 protein were performed twice using two different antibodies against CYP21A2: (A) a rabbit anti-human CYP21A2 polyclonal antibody; (B) a mouse anti-rat Cyp21A1 monoclonal antibody. Microsomal fractions were prepared and 25 µg of microsomal proteins per lane were used for human fetal lungs (lanes 1 to 5) and one adult human adrenal (Adr 1). Molecular weight standards are shown on the left. For lanes 1 to 5, human fetal lungs correspond to female 20 6/7 weeks' gestation, female 23 4/7 weeks' gestation, male 21 1/7 weeks' gestation, male 23 4/7 weeks' gestation, and male 23 2/7 weeks' gestation, respectively. C) Fifteen µg of total protein extracts from fetal lung (from the same subject as for lane 3 in panels A and B), and 2 adrenal samples were analyzed with the rabbit anti-human CYP21A2 polyclonal antibody. D) Fifteen µg of microsome extracts prepared from 3 human fetal lung samples (lanes 1-3) and one adult human adrenal sample (Adr 1) were studied with a rabbit polyclonal anti-CYP17A1 antibody. For lanes 1 to 3: female 21 1/7 weeks' gestation, male 22 1/7 weeks' gestation, and female 21 weeks' gestation. E) Fifteen µg of total protein extract from human adult adrenal (lane 1) and fifteen µg of microsome extracts from human adult adrenal (lane 2) and fetal lung (lane 3, corresponding to lane 3 of panel D) were probed with the anti-CYP17A1 antibody.

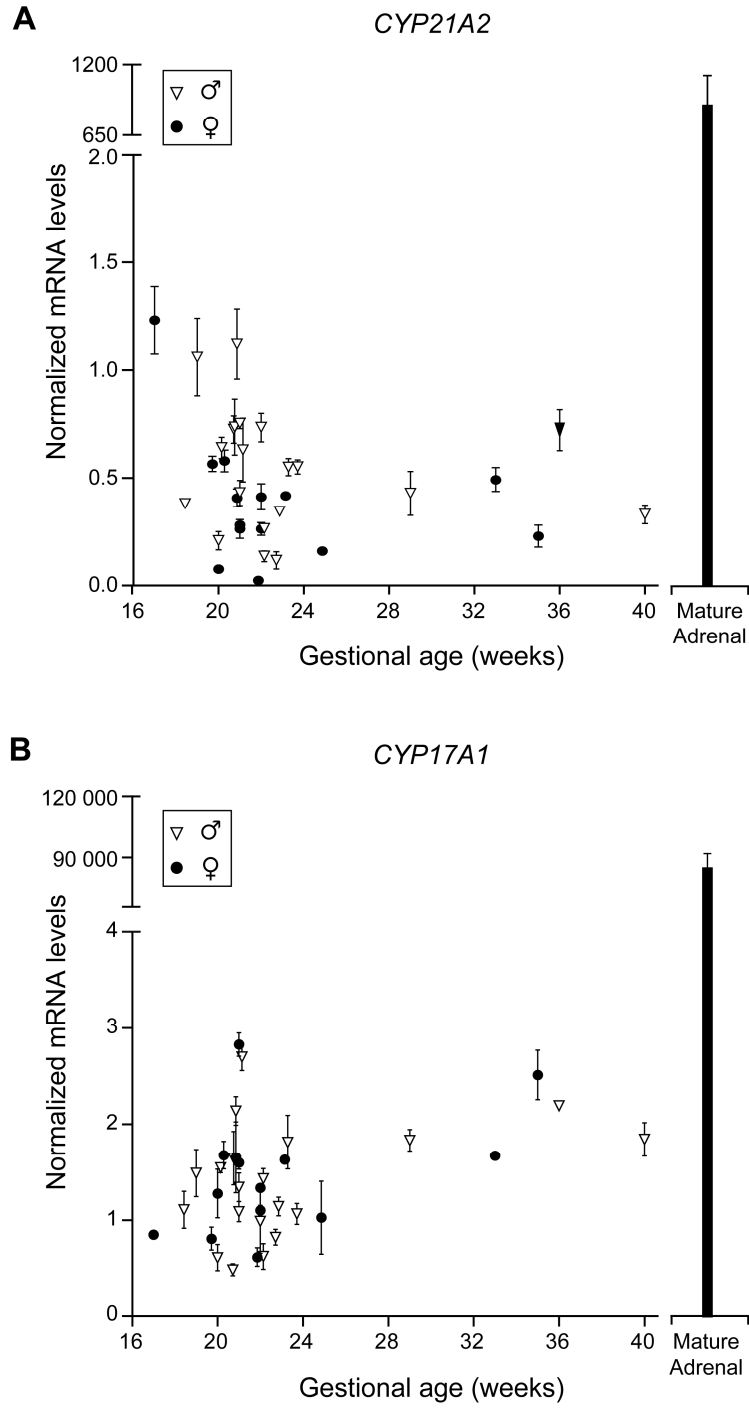
**Figure 17:** Localization of *CYP21A2* mRNA in human fetal lungs by *in situ* hybridization. Antisense *CYP21A2* mRNA probe (A, C-G); sense *CYP21A2* probe (B). Positive signals are blue. Human fetal lungs correspond to: (A, B) female 17 weeks' gestation; (C) male, 22 1/7 weeks' gestation; (D) female 22 weeks' gestation; (E, F) male 23 4/7 weeks' gestation; (G) female 23 1/7 weeks' gestation. A, artery; CZ, conducting zone; E, epithelium; M, mesenchyme, RZ, respiratory zone; V, vein.

**Figure 18:** GR and MR transactivation in epithelial cells expressing *CYP21A2*.

Progesterone can be provided from the circulation where it is abundant during pregnancy, or from local synthesis from CYP11A1 and 3 $\beta$ -HSD-1 ([Pezzi et al., 2003](#)). The products of CYP21A2 (deoxycorticosterone, 11-deoxycortisol) are both GR and MR agonists. There is no *CYP11B1* or *CYP11B2* expression in the human fetal lung. Cortisol is inactivated into cortisone by 11 $\beta$ -HSD-2 in human distal epithelial cells (Garbrecht et al., 2007). GR can be transactivated by deoxycorticosterone /11-deoxycortisol produced within the cell and exerts an intracrine action (A). The circulating levels of deoxycorticosterone and 11-deoxycortisol are too low to transactivate GR. In contrast, MR can be transactivated by aldosterone from the circulation, while deoxycorticosterone /11-deoxycortisol can also activate MR (B).

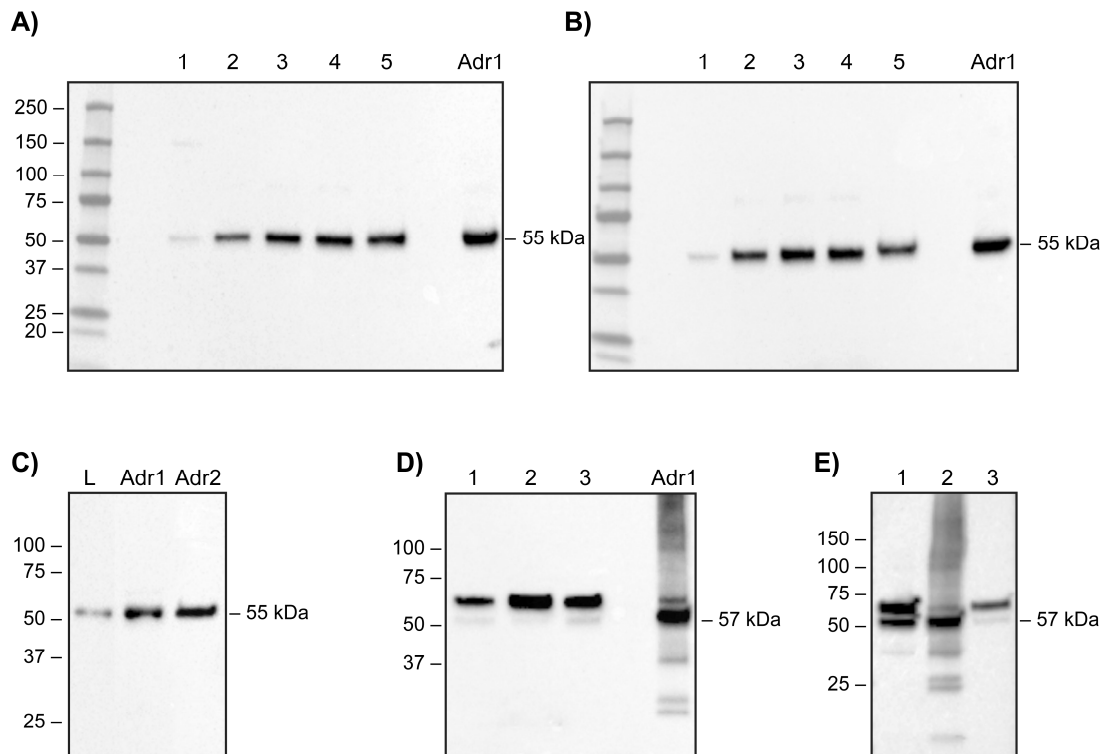


**Figure 14:** Adrenal glucocorticoid and mineralocorticoid pathways.

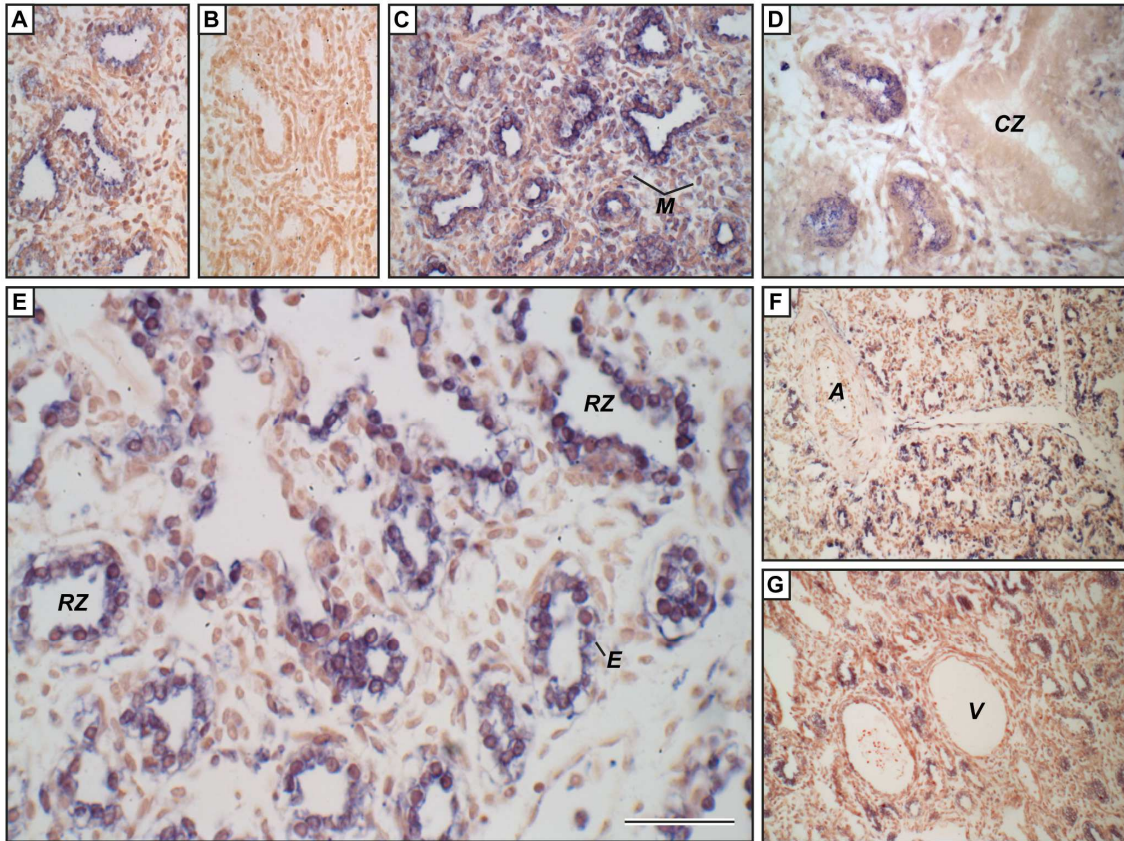


**Figure 15:** Expression of CYP21A2 and CYP17A1 in the human fetal lung.

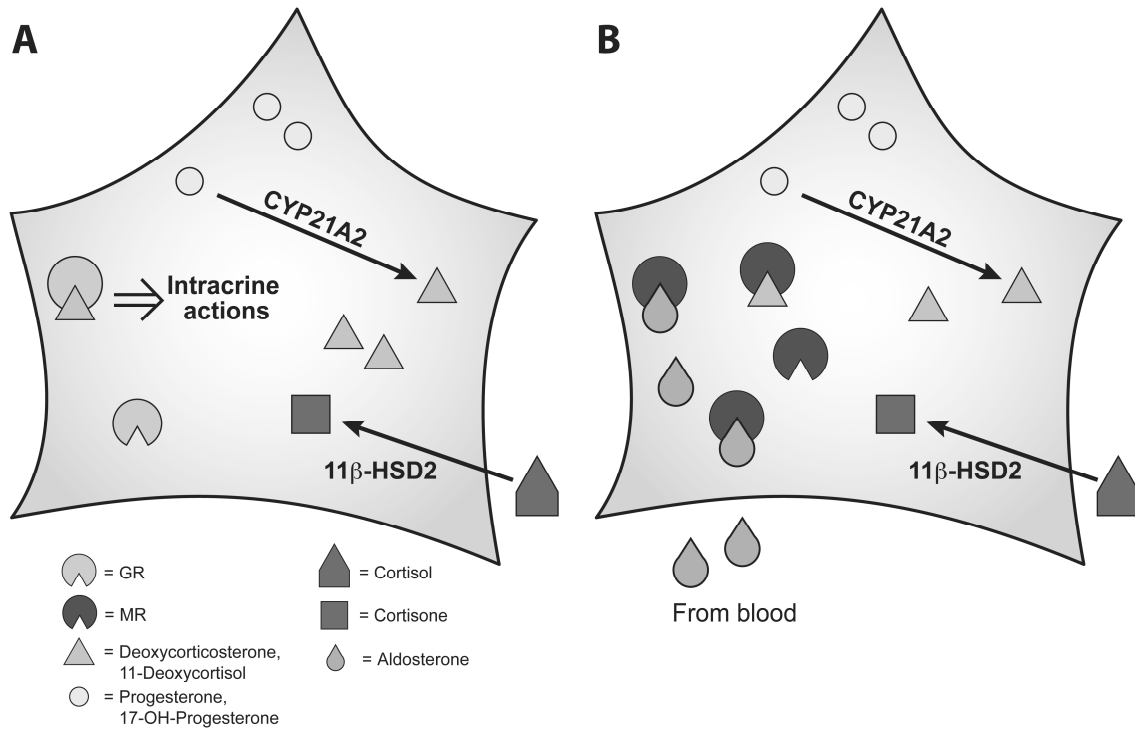




**Figure 16:** CYP21A2 and CYP17A1 proteins in human fetal lungs.



**Figure 17:** Localization of CYP21A2 mRNA in human fetal lungs by *in situ* hybridization.



**Figure 18:** GR and MR transactivation in epithelial cells expressing CYP21A2

**Table9:** Gene-Specific qPCR Conditions

Gene	NCBI Accession Number	qPCR Conditions			
		Primers (Forward / Reverse)	Amplicon Length (bp)	Annealing Temperature (°C)	Acquisition Temperature (°C)
<b>Cyp21A2</b>	NM_000500.5	5'-TGGACGTGATTCCCTTTCTC-3' / 5'-CACCCCTTGGAGCATGTAGT-3'	167	61	84
<b>Cyp11b1</b>	NM_000497.3	5'-TTGCTGTGTCCTCACATGGT-3' / 5'-GTCCGCCTCCAGAATTCATA-3'	178	60	80
<b>Cyp11b2</b>	NM_000498.3	5'-CTGGGACATTGGTACAGGTT-3' / 5'-GCTGGGATCCCGCTTAATGA-3'	762	60	84
<b>P450c17</b>	NM_000102.3	5'-GGACCCTGGCCTTCCTGCTG -3' / 5'-TGGCCTTGTGGGGGATGAGCA-3'	189	64	85
<b>TBP</b>	NM_003194.4	5'-GAACCACGGCACTGATTTTC-3' / 5'-CCCCACCATATTCTGAATCT-3'	158	58	80
<b>SDHA</b>	NM_004168.3	5'-TACAAGGTGCGGATTGATGA-3' / 5'-CACAGTCAGCCTCGTTCAAA-3'	175	59	83

## **Chapitre V : Discussion**

## V-1 Discussion complémentaire au chapitre II

L'étude présentée au chapitre II s'est intéressée à l'identification des meilleurs gènes de normalisation pour la quantification par qPCR des miARNs au cours du développement pulmonaire chez la souris. Cinq gènes de normalisation ont été testés avec 3 méthodes de calculs différentes. Les gènes de normalisation ayant fait l'objet de l'étude sont des petits ARNs nucléolaires (« *small nucleolar RNA* », *snoRNA*) appartenant à la grande famille des ARN non codants. La stabilité de ces gènes de normalisation a été étudiée selon le sexe et différents temps gestationnels, allant du stade pseudoglandulaire au stade alvéolaire ainsi que chez l'adulte. Les trois méthodes d'analyse ont permis de choisir les meilleurs gènes présentant la plus faible variation pour chaque stade du développement ainsi que ceux les plus stables à travers tous les stades.

Suite à la découverte des miARNs au début des années 2000, l'étude de leur expression dans différents modèles expérimentaux a fait l'objet d'un très grand nombre de publications. L'intérêt porté à ces nouvelles molécules régulatrices a aussi permis le développement de plusieurs approches techniques permettant de mieux les étudier. La quantification des miARNs par qPCR était l'un des premiers défis important à relever à cause de leur petite taille qui ne dépasse pas 24 nt. Plusieurs approches ont été développées, cependant les techniques utilisées varient et peuvent introduire des biais dans la quantification des miARNs. Les différentes approches sont basées sur le même principe qui est de prolonger la taille des miARNs lors de la transcription inverse, étape qui sera suivie d'une quantification par qPCR ([Chen et al., 2005](#); [Shi and Chiang, 2005](#)). Pour ce projet nous avons utilisé la méthode de *Chen et al* ([Chen et al., 2005](#); [Varkonyi-Gasic et al., 2007](#)). L'approche de *Chen et al* est basée sur l'utilisation d'une amorce spécifique pour chaque miARN lors de la transcription inverse ([Chen et al., 2005](#)). Cette amorce est caractérisée par une forme en hairpin et une séquence universelle à laquelle sont ajoutés quelques nucléotides spécifiques pour le miARN

d'intérêt. Quant à l'approche de *Shi et al*, elle est basée sur une polyadénylation de l'ARN et une transcription inverse utilisant un oligonucléotide Poly(dT) ([Shi and Chiang, 2005](#)). Avec la première méthode on obtient un ADN complémentaire spécifique pour chaque miARN d'intérêt, contrairement à la deuxième méthode où nous obtenons un ADNc non spécifique. Par la suite, le principe de la PCR est presque similaire entre les deux approches. En effet, dans la première méthode ils utilisent une amorce sens spécifique au miARN et une amorce antisens spécifique à la séquence universelle de l'amorce utilisée lors de la transcription inverse. Dans la deuxième méthode, ils utilisent également une amorce sens spécifique au miARN et une amorce antisens complémentaire à l'oligonucléotide Poly(T). Ces deux approches techniques sont utilisées et commercialisées par plusieurs compagnies. Cette méthode est la plus spécifique et la mieux adaptée à notre étude. En effet, une étude qui a comparé les deux méthodologies a montré que l'utilisation d'une amorce spécifique lors de la transcription inverse augmente la spécificité de la PCR. Cependant, en contrepartie, cette technique est moins adaptée à la quantification des miARNs très faiblement exprimés ([Chugh and Dittmer, 2012](#)). Également, une autre étude a comparé deux kits commerciaux qui se basent sur ces deux méthodes. Cette étude a montré que les deux kits présentaient la même efficacité. Cependant, le kit basé sur la transcription inverse non-spécifique présentait le plus de variabilité. Cependant, le résultat le plus étonnant est que le nombre de copies de miARN calculé à partir de la même courbe standard peut varier significativement entre les deux techniques ([Redshaw et al., 2013](#)). Ces études m'ont conduit à me questionner d'avantage sur la méthodologie qu'on devrait choisir pour quantifier les miARNs, mais également à être prudente quant aux comparaisons des résultats provenant de deux méthodologies différentes.

Nos analyses de stabilité des gènes de référence ont été effectuées avec trois logiciels classiques et couramment utilisés, qui sont geNorm, NormFinder et Bestkeeper. Ces trois logiciels utilisent trois méthodes de calculs différentes. Nos résultats ont montré que les trois méthodes ne donnent pas toujours le même

résultat. Des gènes peuvent être proposés comme étant plus stables avec une méthode et moins stables avec une autre. BestKeeper présente le plus de divergence dans les gènes stables proposés par rapport aux propositions obtenues avec les deux autres logiciels. Ceci n'est pas étonnant car BestKeeper se base sur les valeurs de Cq (cycle de quantification) contrairement aux deux autres méthodes qui utilisent les valeurs rapportées sur une courbe standard ([Pfaffl et al., 2004](#)). NormFinder et geNorm déterminent la variabilité de chaque gène en tenant compte de la variabilité des autres gènes de références dans le but de proposer la meilleure combinaison de gènes stables parmi l'ensemble des gènes analysés ([Andersen et al., 2004](#); [Vandesompele et al., 2002](#)). Nos résultats montrent que ces deux logiciels donnent des résultats presque similaires. Une étude récente a proposé de corriger les valeurs d'expression avec l'efficacité PCR de chaque gène avant de procéder à l'analyse de la stabilité avec les différentes méthodes ([De Spiegelaere et al., 2015](#)). En comparant des valeurs d'expression non-corrigées et corrigées avec l'efficacité PCR, ils ont montré que le classement des gènes selon leur stabilité a changé pour au-delà de 50% des gènes analysés avec geNorm et NormFinder ([De Spiegelaere et al., 2015](#)). Nos travaux ont été publiés un an avant la sortie de cette étude. Ce résultat est intéressant et devrait être pris en considération dans nos conditions expérimentales afin de déterminer si la correction avec l'efficacité PCR aura un impact sur la quantification des miARNs.

Sachant que l'expression de plusieurs gènes varie au cours du développement et que plusieurs présentent un dimorphisme sexuel ([Simard et al., 2006](#)), nous ne pouvons utiliser des gènes de référence sans nous assurer de leur stabilité dans nos propres conditions expérimentales. Nos résultats ont montré l'importance d'analyser la stabilité des gènes de normalisation avant de procéder à une quantification relative des miARNs, car la stabilité des gènes peut varier selon l'âge gestationnel et également selon le sexe. Nos résultats ont montré également que la quantification relative d'un miARN avec des gènes de normalisation qui ne sont pas stables peut introduire une fausse variation qui biaiserait l'interprétation des résultats.



## V-2 Discussion complémentaire au chapitre III

L'étude présentée au chapitre III a porté sur l'étude de l'effet des androgènes sur le profil d'expression des miARNs aux jours gestationnels 17 et 18 chez la souris. L'action des androgènes a été bloquée par le traitement des souris gestantes au flutamide qui est un anti-androgène pur. Le profil d'expression des miARNs a été étudié par microarray et les résultats ont montré que plusieurs miARNs sont modulés par l'action des androgènes à chacun des âges gestationnels étudiés. Également on constate que sur le total de 78 miARNs qui varient en réponse au flutamide, uniquement deux varient significativement à la fois au jour 17 et au jour 18.

Ce résultat peut sembler étonnant puisqu'en 24h d'écart entre les deux jours gestationnels on obtient en réponse au flutamide deux profils d'expression distincts avec uniquement deux miARNs en commun. Ceci peut être expliqué par la courte durée de la gestation chez la souris qui se déroule en 19 jours, période durant laquelle le poumon se développe jusqu'au stade sacculaire. Également cette fenêtre gestationnelle entre les jours 17 et 18 inclut la transition du stade canaliculaire au stade sacculaire. Cette transition est accompagnée de changements liés à la maturation pulmonaire et qui sont probablement régulés par des miARNs.

Dans le but d'identifier les gènes modulés par les androgènes, une étude antérieure effectuée au laboratoire avait été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales et avec les mêmes échantillons d'ARN utilisés dans la présente étude de microarray ([Bresson et al., 2010](#)). Cette étude a montré que sur le total de 3372 gènes qui varient significativement sous l'action du flutamide entre les jours de gestation 17 et 18, uniquement 9% sont communs entre les deux âges. Ce résultat concorde avec le résultat obtenu pour les miARNs. Toutefois, on

remarque que 78 miARNs varient versus 3372 ARNm. Ce constat est attendu sachant que chaque miARN a le potentiel de cibler plusieurs ARNm différents.

La validation de l'expression de certains miARNs a été faite par qPCR sur des échantillons différents de ceux utilisés pour l'analyse en microarray et provenant d'une expérience totalement indépendante. Nos résultats ont montré que sur dix gènes sélectionnés à chaque âge, uniquement six au total ont montré des variations significatives semblables à celles détectées par microarray été validés. Pourquoi observons-nous une telle différence entre les deux techniques? Les résultats obtenus par microarray sont-ils valides? Une des raisons qui peut expliquer cette variation entre les deux techniques est que nous avons modifié la méthode d'échantillonnage utilisé entre l'expérience de microarrays et l'étude de PCR. En effet, pour les analyses de microarray les ARNs provenaient de pools d'individus de portées différentes contrairement aux analyses par qPCR qui ont été effectués sur des ARNs provenant de pools d'individus de la même portée. Dans le cas des microarrays, l'effet de la portée s'il y en a un, est plus amorti par l'échantillonnage contrairement à la deuxième méthode où il obtient une pondération plus significative. Une étude antérieure aussi du laboratoire avait déjà montré que l'expression de certains gènes variait d'une portée à une autre ([Provost et al., 2004](#)). Quand nous analysons nos résultats obtenus par qPCR en séparant les portées, nous constatons qu'il existe de la variabilité inter-portée dans l'expression de certains miARNs, ce qui empêche d'obtenir un résultat significatif. Parmi les solutions qu'on peut entreprendre pour corriger cette variabilité, il y a l'augmentation du nombre de portées et l'analyse simultanée avec des pools d'individus provenant de portées différentes. Ceci nous permettra de savoir jusqu'à quel point l'effet de la portée a un impact sur l'expression des gènes d'intérêt mais ne permettra pas d'exclure l'une ou l'autre méthode d'échantillonnage car les deux sont à prendre en considération. Cependant l'échantillonnage n'est pas le seul élément qui peut expliquer cette discordance dans les résultats. On peut se questionner sur la variabilité entre les deux techniques et son impact sur la reproductibilité des résultats.

Des études ont comparé la quantification des miARNs par microarray et par qPCR. Une étude récente a montré que le taux de validation entre les deux technologies en comparant différentes plateformes de qPCR à différentes plateformes d'hybridation est en moyenne de 54.6% ([Mestdagh et al., 2014](#)). Il est à noter que certaines plateformes d'hybridation présentent des résultats plus reproductibles que d'autres ([Mestdagh et al., 2014](#)). Une autre étude a également comparé les deux technologies en analysant la corrélation entre les données obtenues via les deux techniques. Les résultats obtenus ont montré qu'il existe des variations considérables entre les deux analyses ([Chen et al., 2009](#)). Ils ont montré également que l'analyse par microarray génère plus de faux positifs comparativement à la qPCR avec un taux de 13% et 1% respectivement. Toutefois, d'autres études montrent une bonne corrélation entre les deux techniques ([Ach et al., 2008](#); [Git et al., 2010](#)). Les deux techniques ont leurs points forts et leurs points faibles. L'analyse par microarray permet de faire un criblage d'un grand nombre de miARNs dont l'expression varie dans certaines conditions expérimentales, ce qui est très coûteux à réaliser en qPCR. Pour faire une étude de masse dans un premier temps, l'analyse par microarray reste la technique la mieux adaptée. La validation par qPCR est indispensable pour vérifier la reproductibilité des résultats. Cependant, il faut tenir compte des variations techniques entre les deux technologies. On peut se questionner sur la réelle variabilité qu'on observe avec l'une ou l'autre des techniques et est-ce qu'on peut discriminer les techniques d'hybridation par rapport au qPCR. Probablement qu'une troisième technologie à être développée nous permettrait de trancher.

Nous avons analysé les gènes qui peuvent être ciblés par les miARNs modulés par l'action des androgènes. Cette analyse a été réalisée en combinant les données antérieures d'expression de gènes, obtenues avec les mêmes échantillons ([Bresson et al., 2010](#)). Nous avons sélectionné pour cette étude uniquement les gènes cibles variant sous l'action des androgènes dans le sens inverse des miARNs, ce qui correspond à une régulation négative (dégradation)

des ARNm cibles par les miARNs. L'autre aspect de la régulation par les miARNs correspondant à l'inhibition de la traduction n'a pu être pris en considération car nous n'avons pas d'études de protéomique prévue à cet effet. La régulation par inhibition de la traduction va se refléter sur le niveau des protéines et non sur les niveaux d'ARNm. Cet aspect de la régulation devrait être abordé pour construire un portrait plus complet de la modulation de l'action des miARNs par les androgènes au cours du développement pulmonaire.

L'analyse des processus biologiques et des fonctions moléculaires dans lesquelles sont impliqués les microARNs modulés par les androgènes, montre que les androgènes peuvent réguler via les microARNs différents processus cellulaires tels que la différenciation et la prolifération cellulaire. Également les androgènes peuvent réguler certaines voies de signalisations telles que la voie wnt- $\beta$ /caténine et la voie Notch. En effet, nos résultats montrent que les androgènes favorisent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie Notch notamment *Jag1*, *adam10* et *adam 17*, en régulant négativement les miARNs. Dans le poumon en développement, la voie Notch est impliquée dans la différenciation des cellules épithéliales ciliées. Également d'autres gènes impliqués dans la différenciation cellulaire sont modulés positivement par les androgènes notamment *Tle4*, *Igf1* et *Igf2*. Ces résultats montrent que les androgènes peuvent exercer une pression positive via les microARNs lors de la maturation pulmonaire. En d'autre part, les androgènes peuvent aussi réguler négativement la formation des structures épithéliales distales en favorisant l'expression de microARNs qui ciblent le facteur de transcription *coup-tfII*. Ces résultats montrent que les androgènes sont des régulateurs importants lors de la maturation pulmonaire et qu'ils peuvent agir via les micro-ARNs en exerçant des effets positifs mais également négatifs sur la différenciation cellulaire. Cette pression négative et positive exercée par les androgènes suscite un questionnement sur l'origine de la différence sexuelle dans le SDR. Le rôle des androgènes dans le retard de maturation du poumon fœtal mâle est déjà établi et confirmé par différentes études ([Seaborn et al., 2010](#)). Cependant le mécanisme régulant cet effet négatif semble complexe. Les

androgènes stimulent les ramifications pulmonaires et la prolifération cellulaire retardant ainsi la différenciation cellulaire ([Levesque et al., 2000](#)). Sachant que la capacité de synthèse et inactivation des androgènes dans le poumon fœtal varie d'un individu à un autre, le poumon peut répondre de façon variable aux androgènes. Ceci peut être à l'origine de la complexité de la régulation de la différence sexuelle dans le développement pulmonaire via les androgènes. Cette variation dans la synthèse et inactivation des androgènes par le poumon fœtal peut être due à d'autres membres d'ARN non codants notamment les LncRNA (long non-coding RNA). Les LncRNA interviennent dans la régulation épigénétique puisqu'ils servent de molécules d'échafaudage pour des complexes de modification de la chromatine afin de réprimer l'expression d'un gène cible ([Dey et al., 2014](#)). Les LncRNA sont faiblement exprimés et leur expression peut provenir d'une réponse à certains stimuli cellulaires. La synthèse et inactivation des androgènes dans le poumon fœtal peut être régulée par ces LncRNA et être à l'origine de la réponse variable du poumon fœtal à l'action des androgènes.

### V-3 Discussion complémentaire au chapitre IV

L'étude présentée au chapitre IV a porté sur l'analyse de l'expression de l'enzyme 21-hydroxylase dans le poumon fœtal humain. Cette étude a montré que l'enzyme 21-hydroxylase est présente ainsi que son ARNm. Les produits de la 21-hydroxylase sont capables de lier et activer GR. L'expression des gènes de la 11 $\beta$ -hydroxylase et de l'aldostérone synthase a également été investiguée et leurs ARNm respectifs n'ont pas été détectés dans les tissus analysés. En conséquence, les produits de la 21-hydroxylase ne sont pas transformés en aldostérone ou en cortisol/corticostérone dans les poumons fœtaux humains. L'ARNm et la protéine de l'enzyme 17 $\alpha$ -hydroxylase ont également été détectés dans nos tissus fœtaux humains. La présence de cette enzyme suggère que le substrat et le produit de la 21-hydroxylase peuvent être la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone et le 11-désoxycortisol, respectivement. Le 11-désoxycortisol est un agoniste de GR tout comme la DOC.

Les résultats de cette étude sont compatibles avec les études antérieures du laboratoire effectuées chez le modèle murin. Ces dernières ont montré que toutes les enzymes de la voie de synthèse des glucocorticoïdes sont exprimées dans le poumon en développement hormis la 11 $\beta$ -hydroxylase qui n'est détectée qu'au stade pseudoglandulaire ([Boucher et al., 2014](#); [Provost and Tremblay, 2005](#)). Cependant dans notre étude actuelle, nous n'avons pas d'échantillons provenant de ce stade du développement. L'expression de la 11 $\beta$ -hydroxylase, uniquement au stade pseudoglandulaire, suggère qu'il y aurait une sélection des agonistes de GR aux stades avancés du développement pulmonaire favorisant le désoxycorticostérone/11-désoxycortisol au détriment du corticostérone/ cortisol par rapport au stade pseudoglandulaire. On peut donc se questionner sur la pertinence de cette modulation et l'avantage d'une synthèse locale de désoxycorticostérone/11-désoxycortisol. On pourrait émettre l'hypothèse qu'après le stade pseudoglandulaire, le poumon fœtal synthétise *de novo* des glucocorticoïdes ne pouvant pas être inactivés par l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2, qui est

exprimée dans l'épithélium distal ([Garbrecht et al., 2007](#)) tout comme la 21-hydroxylase dans notre étude.

Nos résultats d'hybridation *in situ* ont montré que l'enzyme 21-hydroxylase est localisée presque exclusivement dans l'épithélium distal (bronchioles et conduits alvéolaires) dans la zone respiratoire et qu'elle est absente de l'épithélium proximal (trachée et bronches). La présence de la 21-hydroxylase dans l'épithélium distal appuie l'importance de cette enzyme dans la maturation pulmonaire. GR est exprimé également dans les cellules épithéliales ce qui suggère une action intracrine / paracrine des produits de la 21-hydroxylase. Cependant, l'expression de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2 dans les cellules épithéliales et non dans le mésenchyme favorise l'hypothèse d'une action intracrine ([Garbrecht et al., 2007](#)). Dans le cas de l'absence de la 11 $\beta$ -HSD2 dans le mésenchyme, GR serait occupé par le cortisol circulant, ce qui n'est pas le cas dans les cellules épithéliales exprimant la 11 $\beta$ -HSD2. L'importance des glucocorticoïdes a été démontrée par plusieurs modèles de souris transgéniques n'exprimant pas GR. Les souris ayant des délétions totales de GR présentent des difficultés respiratoires et 100% de mortalité quelques heures après la naissance ([Cole et al., 1995](#)). Cependant, sachant que GR est exprimé de façon ubiquitaire dans le tissu pulmonaire ([Kitraki et al., 1997](#); [Speirs et al., 2004](#)) et que nos résultats indiquent que la 21-hydroxylase est exprimée principalement dans les cellules épithéliales, on peut se questionner sur le rôle joué par GR dans le mésenchyme. Au début des années 80, des études ont proposé que les glucocorticoïdes stimulaient, au niveau du mésenchyme, la synthèse d'un facteur nommé FPF (*fibroblast pneumocyte factor*) qui stimulait à son tour la synthèse du surfactant par les cellules épithéliales de type II ([Post et al., 1984](#); [Smith, 1979](#)). Néanmoins, ce facteur n'a jamais été identifié jusqu'à aujourd'hui. Il a été observé que certains facteurs miment l'action du FPF tel que la leptine ou la neuregulin-1 $\beta$  dont l'expression est également stimulée par les glucocorticoïdes ([King et al., 2014](#); [Torday et al., 2002](#)). Également, l'importance de l'action des glucocorticoïdes dans l'épithélium par rapport à leur action dans le mésenchyme est controversée. Des études récentes

indiquent que la fonction des glucocorticoïdes dérivés de l'activation de GR dans le mésenchyme est la plus importante pour la maturation pulmonaire et la survie à la naissance. Ces études ont montré que la délétion de GR au niveau du mésenchyme mène au même phénotype observé chez les souris ayant une délétion générale de GR ([Bird et al., 2014](#); [Habermehl et al., 2011](#); [Li et al., 2013](#)). Ces études ont également montré que la délétion de GR dans l'épithélium a peu ou pas d'effet sur la structure pulmonaire et ne mène pas à la mortalité néonatale ([Alanis et al., 2014](#); [Bird et al., 2014](#); [Habermehl et al., 2011](#)). Les résultats de ces études de délétions conditionnelles de GR proposent alors que l'action, nécessaire des glucocorticoïdes pour le développement du système respiratoire et la survie néonatale, passe principalement par le mésenchyme. En effet, le mésenchyme joue un rôle important dans les premiers stades du développement et produit plusieurs facteurs tels que *FGF10* et *FGF7* importants pour la maturation de l'épithélium distal ([Shannon and Hyatt, 2004](#); [Shannon et al., 1998](#)). Donc la délétion de GR dans le mésenchyme affecterait l'épithélium et mènerait à un système respiratoire immature et non fonctionnel. Contrairement à cela, la délétion de GR dans l'épithélium aura moins d'impact si l'action des glucocorticoïdes dans le mésenchyme est intacte, car ils stimuleront la synthèse de facteurs de maturation qui agiront via une action paracrine sur l'épithélium. Toutefois, une autre étude a démontré que la délétion de GR dans l'épithélium mène à 50% de mortalité néonatale et une structure pulmonaire ressemblant à celle des souris ayant une délétion générale de GR ([Manwani et al., 2010](#)). Les différences observées entre ces différentes études seraient attribuées aux différentes souches de souris utilisées ainsi que les différents systèmes de délétion. Il faut noter que plusieurs études ont montré que les glucocorticoïdes sont importants durant les derniers stades du développement où ils stimulent la différenciation des cellules épithéliales de type I et II ([Cole et al., 2004](#); [Muglia et al., 1999](#)) sans déterminer si cette action passe par l'activation de GR dans les cellules épithéliales ou mésenchymales. Les modèles transgéniques cités plus haut ne peuvent pas conclure que l'importance de l'activation de GR dans l'épithélium est mineure. En effet, les glucocorticoïdes peuvent avoir plusieurs actions intracrine dans les



cellules épithéliales distales, notamment la stimulation de la synthèse des protéines du surfactant, qui sont déjà connues pour être stimulées par l'action de GR épithélial. Également, les glucocorticoïdes stimulent l'expression du canal épithélial sodique (ENaC), favorisent la différenciation cellulaire et diminuent la prolifération.

Nos résultats d'hybridation *in situ* proviennent de tissus de poumons fœtaux humains dont les âges varient entre 17 et 23 <sup>4/7</sup> semaines de gestation. Cette courte fenêtre gestationnelle couvre uniquement le stade canaliculaire. Un seul tissu a montré un très faible signal au niveau du mésenchyme. Nous ne pouvons pas tirer de conclusions sur l'existence ou non d'une expression de la 21-hydroxylase dans le mésenchyme à d'autres temps de gestation. Il est possible qu'il existe une régulation spatio-temporelle de l'expression de la 21-hydroxylase au cours du développement. D'autant plus que chez la souris, les niveaux d'ARNm de la 21-hydroxylase augmentent au début de l'alvéolarisation ([Boucher et al., 2014](#)), ce qui pourrait être associé à une expression mésenchymale et épithéliale de la 21-hydroxylase. Ceci n'a pu être confirmé dans notre étude, nous n'avons qu'un seul échantillon d'ARN provenant de fœtus âgé de 40 semaines de gestation.

Les produits de la 21-hydroxylase, désoxycorticostérone/11-désoxycortisol, sont également connus pour être des agonistes de MR ([Close et al., 2010](#); [Lu et al., 2006](#)). MR est également exprimé dans l'épithélium pulmonaire distal ([Martinerie et al., 2013](#)), cependant son rôle semble mineur dans le poumon. Des études ont montré que les souris n'exprimant pas MR décèdent suite à des complications liées à l'incapacité de réabsorption du sodium mais ne présentent pas de difficultés respiratoires ([Hubert et al., 1999](#)). Il a également été démontré que, dans le poumon en développement, ENaC est modulé par l'action des glucocorticoïdes via l'activation de GR. Généralement ce rôle est attribué aux minéralocorticoïdes via l'activation de MR, tel que dans les reins ([Chen et al., 1999](#)). La question qui se pose c'est est-ce que les produits de la 21-hydroxylase

vont lier GR ou MR ou les deux ? Et quel est la pertinence de leur expression ? Les produits de la 21-hydroxylase peuvent être inactivés par l'activité 20 $\alpha$ -HSD de l'enzyme 17 $\beta$ -HSD5, cependant il a été démontré que cette enzyme est très faiblement exprimée dans l'épithélium pulmonaire distal. Également, l'enzyme 20 $\alpha$ -HSD capable d'inactiver les produits de la 21-hydroxylase est exprimée dans le poumon fœtal murin ([Boucher, Provost et al. 2014](#)). Il serait donc intéressant d'investiguer l'expression et la localisation de la 20 $\alpha$ -HSD dans le poumon humain fœtal.

Les niveaux fœtaux circulants d'aldostérone sont suffisants pour activer MR ([Hellal-Levy et al., 1999](#); [Sippell et al., 1978](#)), d'autant plus que l'épithélium pulmonaire distal exprime la 11 $\beta$ -HSD2 ([Garbrecht et al., 2007](#)) qui va inactiver le cortisol provenant de la circulation afin de favoriser la liaison de l'aldostérone à MR. Également la 11- $\beta$ HSD2, en inactivant le cortisol circulant, va favoriser l'activation locale de GR par les produits de la 21-hydroxylase synthétisés *de novo* et qui ne sont pas des substrats de la 11 $\beta$ -HSD2. Les niveaux fœtaux circulants de désoxycorticostérone/11-désoxycortisol sont insuffisants pour activer GR ([Medh et al., 1998](#); [Nahoul et al., 1988](#); [Sippell et al., 1978](#)). Ce qui est en faveur de nos résultats et notre hypothèse suggérant une action intracrine des produits de la 21-hydroxylase dans les cellules épithéliales.

## **Chapitre VI : Conclusions et perspective**

## **VI-1 Conclusions principales relatives aux hypothèses et objectifs des projets**

L'hypothèse relative au chapitre IV proposait que le poumon humain fœtal exprime l'enzyme 21-hydroxylase. Les objectifs associés à cette hypothèse étaient de déterminer l'expression de la 21-hydroxylase par différentes approches techniques. Les résultats présentés au chapitre IV montrent que l'ARNm et la protéine de la 21-hydroxylase sont présents dans le poumon humain fœtal. Nous avons quantifié l'expression du gène *CYP21A2* par qPCR dans des tissus fœtaux âgés de 17 à 40 semaines de gestation, et nous avons observé que *CYP21A2* ne présente pas de différences d'expression selon l'âge ou selon le sexe. Afin de déterminer si les produits de la 21-hydroxylase sont convertis en cortisol/corticostérone et en aldostérone, nous avons investigué l'expression de *CYP11B1* et *CYP11B2*. Les ARNm de ces deux gènes n'ont été détectés dans aucun de nos échantillons. Nos résultats ont également montré la présence de l'ARNm et de la protéine du gène de la 17 $\alpha$ -hydroxylase dans les poumons fœtaux humains. L'expression de *CYP17A1* indique que l'un des substrats de la 21-hydroxylase peut être la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone qui mènera au 11-désoxycortisol comme produit. Nous avons également localisé l'expression de *CYP21A2* par hybridation in situ. Nos résultats ont montré que *CYP21A2* est localisé principalement dans l'épithélium distal. Les produits de la 21-hydroxylase peuvent également lier MR, cependant les niveaux élevés d'aldostérone circulante minimise la possibilité de liaison des produits de la 21-hydroxylase à MR. Tous les résultats obtenus dans cette étude valident notre hypothèse de départ et suggèrent une synthèse in situ des glucocorticoïdes dans le poumon en développement.

L'hypothèse relative aux chapitres II et III présumait que les androgènes régulent l'expression de certains miARNs au cours du développement fœtal tardif chez la souris. Afin de valider cette hypothèse, le premier objectif fixé était d'ordre méthodologique puisqu'on devait identifier les meilleurs gènes de normalisation

pour quantifier les miARNs au cours du développement pulmonaire. Trois approches de calculs différentes ont été utilisées afin d'analyser la stabilité de cinq gènes non-codants. Nos résultats ont montré que la stabilité de ces gènes varie selon le stade du développement et varie également selon le sexe. Cette étude nous a permis d'identifier les combinaisons de gènes de référence les plus stables à chaque stade du développement pour les deux sexes. Le deuxième objectif fixé pour valider notre hypothèse, portait sur l'étude du profil d'expression des miARNs en inhibant l'action des androgènes par l'injection du flutamide aux mères gestantes. Le profil d'expression a été analysé aux jours gestationnels 17 et 18 par microarray. Nos résultats ont montré que l'expression de plusieurs miARNs est modulée par l'action des androgènes aux deux jours gestationnels étudiés. Cette régulation par les androgènes a été vérifiée pour certains miARNs par qPCR avec des échantillons provenant d'une nouvelle expérimentation. Également nous avons combinés les données d'expression des miARNs avec des données d'expression d'ARNm obtenues avec les mêmes échantillons. Cette combinaison de données nous a permis d'identifier des cibles potentielles qui peuvent être régulées par les miARNs et qui sont impliqués dans plusieurs processus biologiques liés au développement pulmonaire. Nos résultats suggèrent que les androgènes peuvent exercer à la fois une pression négative et positive sur l'expression de certains gènes impliqués dans la maturation pulmonaire, via la régulation des miARNs. Notamment, les androgènes régulent négativement la formation des structures pulmonaires distales en modulant positivement l'expression de certains miARNs qui ciblent le facteur de transcription COUP-TFII. Également, les androgènes peuvent moduler positivement des facteurs de croissance tels qu'IGF1 et IGF2 en régulant négativement les miARNs qui les ciblent. Nos résultats confirment notre hypothèse en démontrant que les androgènes régulent l'expression des miARNs au cours du développement pulmonaire tardif.

## **VI-2 Perspectives**

### **VI-2-1 Perspectives liées à la synthèse locale des glucocorticoïdes dans le poumon en développement**

Nos résultats montrent que l'enzyme 21-hydroxylase est exprimée dans l'épithélium distal du poumon humain fœtal au stade canaliculaire et montrent que les enzymes 11 $\beta$ -hydroxylase et aldostérone synthase ne sont pas exprimées, ce qui suggère que les produits de la 21-hydroxylase seraient les glucocorticoïdes actifs dans le poumon en développement et qu'ils agiraient via un mode d'action intracrine sur les cellules épithéliales. Toutefois, les modèles de souris transgéniques n'exprimant pas GR montrent que l'action des glucocorticoïdes au niveau du mésenchyme est primordiale à la maturation pulmonaire et la survie néonatale. Il serait donc d'un grand intérêt d'investiguer la localisation de la 21-hydroxylase dans tous les stades du développement car elle pourrait être exprimée dans le mésenchyme à d'autres stades et non au stade canaliculaire. La 21-hydroxylase pourrait être co-localisée dans l'épithélium et dans le mésenchyme à certains stades du développement comme elle pourrait être exprimée spécifiquement dans un type cellulaire à d'autres stades. Cette question/réponse nous informera s'il existe une modulation de la localisation de la 21-hydroxylase au cours du développement. Bien que nous ayons démontré l'expression de l'ARNm et de la protéine de la 21-hydroxylase dans le poumon humain fœtal, son activité devrait également être confirmée. Comme nos résultats l'indiquent, la 17 $\alpha$ -hydroxylase est également exprimée dans le poumon fœtal. L'analyse de son activité nous permettrait de déterminer si la 17-hydroxyprogestérone est un substrat de la 21-hydroxylase, ce qui mènerait à la production de 11-désoxycortisol comme glucocorticoïde actif dans le poumon fœtal humain. Alternativement, le 11-désoxycortisol et le désoxycorticostérone pourraient être synthétisés en même temps et agir tous les deux comme glucocorticoïdes actifs.

Comme présentée dans des études antérieures du laboratoire, l'enzyme 20 $\alpha$ -HSD est exprimée dans le poumon fœtal murin ([Boucher et al., 2014](#), [2015](#)). Cette enzyme peut réguler la synthèse in situ des glucocorticoïdes. En effet la 20 $\alpha$ -HSD peut inactiver le substrat et le produit de la 21-hydroxylase en inactivant la progestérone en 20 $\alpha$ -hydroxyprogestérone et le désoxycorticostérone en 20 $\alpha$ -désoxycorticostérone, respectivement. Afin de mieux comprendre le rôle de cette enzyme dans le poumon fœtal humain, l'étude de son expression, au cours du développement, devrait être envisagée. L'étude de la localisation de la 20 $\alpha$ -HSD permettra d'identifier dans quel type cellulaire elle est exprimée afin de déterminer si son rôle est de limiter l'accès de la progestérone circulante vers le poumon, ou d'inhiber localement la synthèse des glucocorticoïdes. Il faut noter également que l'enzyme 17 $\beta$ -HSD2 est capable de transformer la 20 $\alpha$ -hydroxyprogestérone en progestérone. La 17 $\beta$ -HSD2 est exprimée également au stade canaliculaire dans l'épithélium et le mésenchyme du poumon fœtal humain ([Simard et al., 2010](#)). Ses niveaux d'ARNm augmentent avec l'âge gestationnel de 17 à 40 semaines de gestation ([Simard et al., 2010](#)). Il serait intéressant d'analyser également la localisation de la 17 $\beta$ -HSD2 dans d'autres stades du développement afin de déterminer son rôle dans la régulation de la synthèse in situ des glucocorticoïdes.

Jusqu'à présent, on ne connaît pas précisément le mode d'action des glucocorticoïdes sur la maturation pulmonaire. Il serait intéressant d'investiguer les voies de signalisation qui sont ciblées par l'action des glucocorticoïdes au cours du développement pulmonaire. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans les différents stades du développement pulmonaire, notamment la voie des BMP, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, la voie Notch, ainsi que les voies des facteurs de croissance (TGF, FGF, IGF) et des facteurs de transcription ([Herriges and Morrisey, 2014](#)). Certains gènes impliqués dans ces voies sont activés par GR. Par exemple, *Smad1* qui est impliqué dans la voie des BMP est activé par GR ([Schwartz et al., 2014](#)). Également, les facteurs de transcription *TTF-1* et *C/EBP $\alpha$* , importants pour la différenciation épithéliale durant la maturation tardive du poumon, sont aussi activés par GR ([Berg et al., 2005](#); [Kolla et al., 2007](#); [Maeda](#)

[et al., 2006](#)). Cependant, nous ne connaissons pas toute la cascade de gènes qui sont ciblés par les glucocorticoïdes. Une étude pourrait donc être réalisée sur des cultures primaires ou des explants qui seraient traitées avec un antagoniste aux glucocorticoïdes ou des GCs suivi d'une analyse protéomique afin d'identifier les protéines modulées. Cette étude nous permettrait de mieux connaître les mécanismes d'action des glucocorticoïdes synthétisés localement. On pourrait également étudier l'effet à court et long terme de pulses de glucocorticoïdes à différents temps de gestation.

### **VI-2-2 Perspectives liées à l'expression des miARNs dans le poumon fœtal et l'effet des androgènes sur leur expression**

L'analyse des résultats de microarrays montrent que les androgènes affectent l'expression de certains miARNs aux jours gestationnels 17 et 18 chez les fœtus mâles. Ces résultats indiquent que des miARNs sont impliqués dans l'action des androgènes sur le développement pulmonaire. Fait intéressant, on observe qu'uniquement deux miARNs sont régulés par les androgènes à la fois au jour 17 et au jour 18. Ceci indique que la régulation de l'expression des miARN est très dynamique dans le poumon en développement. Il serait donc intéressant d'analyser les profils d'expression sous l'effet des androgènes à travers tous les stades du développement. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter, certains miARNs seraient modulés par les androgènes spécifiquement à certains stades, ou alors seraient co-modulés par les androgènes au cours du développement. La modulation par les androgènes peut varier d'un stade à un autre dépendamment des gènes qui seront ciblés par le miARN. Ceci nous permettra d'identifier à chaque stade du développement les voies de signalisation modulées par les androgènes et les miARNs.

Notre étude a permis d'associer les miARNs avec des cibles potentielles qui sont d'intérêt pour le développement pulmonaire. Cependant ces gènes devraient être validés pour déterminer s'ils sont des cibles réelles des miARNs sous l'effet du



flutamide. Cette étude peut être réalisée sur culture primaire en transfectant soit des anti-miARNs ou des mimiques de miARNs d'intérêt et analyser l'expression du gène cible.

La régulation des processus physiologiques par les miARNs est très complexe. La régulation peut se faire par l'association de l'action de plusieurs miARNs. Parmi les miARNs régulés dans notre étude, on note le miARN Let-7 qui est modulé négativement par les androgènes au jour gestationnel 17. Il a été démontré que Let-7 fait partie des miARNs les plus abondants au jour gestationnel 17.5 ([Carraro et al., 2014](#); [Lu et al., 2008](#)). Les androgènes régulent négativement l'expression de Let-7 uniquement au jour 17 et n'affecte pas son expression au jour 18. Cette régulation négative de Let-7 au jour 17 est en faveur de l'expression de certains gènes cibles qui stimulent la différenciation cellulaire. Cette régulation ponctuelle de Let-7 indique qu'il pourrait jouer un rôle important dans le développement pulmonaire. Il serait intéressant de déterminer l'expression de Let-7 chez les femelles afin de savoir si la régulation par les androgènes se transpose chez les deux sexes. Let-7 peut être un bon candidat à étudier dans la maturation pulmonaire. On peut déterminer l'effet *ex vivo* de son expression sur la morphologie des explants de poumons fœtaux à différents âges gestationnels, et analyser la morphologie du poumon ainsi que l'expression de plusieurs gènes cibles. On peut également utiliser la nébulisation comme méthode de livraison du miARNs pour voir son effet *in vivo*.

## **Bibliographie (les références du laboratoire sont en caractère gras)**

Abbott, A.L., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E.A., Lau, N.C., Bartel, D.P., Horvitz, H.R., and Ambros, V. (2005). The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental cell* 9, 403-414.

Ach, R.A., Wang, H., and Curry, B. (2008). Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC biotechnology* 8, 69.

Adams-Chapman, I. (2006). Neurodevelopmental outcome of the late preterm infant. *Clinics in perinatology* 33, 947-964; abstract xi.

Adamski, J., Normand, T., Leenders, F., Monte, D., Begue, A., Stehelin, D., Jungblut, P.W., and de Launoit, Y. (1995). Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *The Biochemical journal* 311 ( Pt 2), 437-443.

Afsar, F.S. (2010). Physiological skin conditions of preterm and term neonates. *Clinical and experimental dermatology* 35, 346-350.

Akeson, A.L., Cameron, J.E., Le Cras, T.D., Whitsett, J.A., and Greenberg, J.M. (2005). Vascular endothelial growth factor-A induces prenatal neovascularization and alters bronchial development in mice. *Pediatric research* 57, 82-88.

Alanis, D.M., Chang, D.R., Akiyama, H., Krasnow, M.A., and Chen, J. (2014). Two nested developmental waves demarcate a compartment boundary in the mouse lung. *Nature communications* 5, 3923.

Albertsen, K., Andersen, A.M., Olsen, J., and Gronbaek, M. (2004). Alcohol consumption during pregnancy and the risk of preterm delivery. *American journal of epidemiology* 159, 155-161.

Alejandre-Alcazar, M.A., Michiels-Corsten, M., Vicencio, A.G., Reiss, I., Ryu, J., de Krijger, R.R., Haddad, G.G., Tibboel, D., Seeger, W., Eickelberg, O., *et al.* (2008). TGF-beta signaling is dynamically regulated during the alveolarization of rodent and human lungs. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 259-269.

Anadkat, J.S., Kuzniewicz, M.W., Chaudhari, B.P., Cole, F.S., and Hamvas, A. (2012). Increased risk for respiratory distress among white, male, late preterm and term infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 32, 780-785.

Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64, 5245-5250.

Ando, A., Kikuti, Y.Y., Shigenari, A., Kawata, H., Okamoto, N., Shiina, T., Chen, L., Ikemura, T., Abe, K., Kimura, M., *et al.* (1996). cDNA cloning of the human homologues of the mouse Ke4 and Ke6 genes at the centromeric end of the human MHC region. *Genomics* 35, 600-602.

Andres, R.L., and Day, M.C. (2000). Perinatal complications associated with maternal tobacco use. *Seminars in neonatology* : SN 5, 231-241.

Arpino, C., Compagnone, E., Montanaro, M.L., Cacciatore, D., De Luca, A., Cerulli, A., Di Girolamo, S., and Curatolo, P. (2010). Preterm birth and neurodevelopmental outcome: a review. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 26, 1139-1149.

Auchus, R.J. (2004). The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15, 432-438.

Auchus, R.J., Lee, T.C., and Miller, W.L. (1998). Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *The Journal of biological chemistry* 273, 3158-3165.

Avery, M.E., and Mead, J. (1959). Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *A.M.A. journal of diseases of children* 97, 517-523.

Baker, B.Y., Yaworsky, D.C., and Miller, W.L. (2005). A pH-dependent molten globule transition is required for activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *The Journal of biological chemistry* 280, 41753-41760.

Baker, M.E., Nelson, D.R., and Studer, R.A. (2015). Origin of the response to adrenal and sex steroids: Roles of promiscuity and co-evolution of enzymes and steroid receptors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 151, 12-24.

Banerjee, A., Schambach, F., DeJong, C.S., Hammond, S.M., and Reiner, S.L. (2010). Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. *European journal of immunology* 40, 225-231.

Barber, M., and Blaisdell, C.J. (2010). Respiratory causes of infant mortality: progress and challenges. *American journal of perinatology* 27, 549-558.

Barnes-Powell, L.L. (2007). Infants of diabetic mothers: the effects of hyperglycemia on the fetus and neonate. *Neonatal network : NN* 26, 283-290.

Bashirullah, A., Pasquinelli, A.E., Kiger, A.A., Perrimon, N., Ruvkun, G., and Thummel, C.S. (2003). Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Developmental biology* 259, 1-8.

Baum, M., Schiff, E., Kreiser, D., Dennerly, P.A., Stevenson, D.K., Rosenthal, T., and Seidman, D.S. (2000). End-tidal carbon monoxide measurements in women with pregnancy-induced hypertension and preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* 183, 900-903.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* 20, 1885-1898.

Behrman, R.E., and Butler, A.S. (2007). In *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention* (Washington (DC)).

Bélanger, A., Candas, B., Dupont, A., Cusan, L., Diamond, P., Gomez, J.L., and Labrie, F. (1994). Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1086-1090.

Benlhabib, H., Guo, W., Pierce, B.M., and Mendelson, C.R. (2015). The miR-200 Family and Its Targets Regulate Type II Cell Differentiation in Human Fetal Lung. *The Journal of biological chemistry* 290, 22409-22422.

Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Molecular cell* 28, 328-336.

Berg, T., Didon, L., Barton, J., Andersson, O., and Nord, M. (2005). Glucocorticoids increase C/EBPbeta activity in the lung epithelium via phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 334, 638-645.

Berger, S., Bleich, M., Schmid, W., Cole, T.J., Peters, J., Watanabe, H., Kriz, W., Warth, R., Greger, R., and Schutz, G. (1998). Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na<sup>+</sup> metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9424-9429.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

Bhaskaran, M., Wang, Y., Zhang, H., Weng, T., Baviskar, P., Guo, Y., Gou, D., and Liu, L. (2009). MicroRNA-127 modulates fetal lung development. *Physiological genomics* 37, 268-278.

Bhaskaran, M., Xi, D., Wang, Y., Huang, C., Narasaraju, T., Shu, W., Zhao, C., Xiao, X., More, S., Breshears, M., *et al.* (2012). Identification of microRNAs changed in the neonatal lungs in response to hyperoxia exposure. *Physiological genomics* 44, 970-980.

Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Collins, N.R., Thomson, M.J., Geistlinger, T.R., Carroll, J.S., Brown, M., Hammond, S., Srour, E.F., Liu, Y., *et al.* (2009). Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic acids research* 37, 4850-4861.

Bin-Nun, A., Bromiker, R., Wilschanski, M., Kaplan, M., Rudensky, B., Caplan, M., and Hammerman, C. (2005). Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *The Journal of pediatrics* 147, 192-196.

Binet, M.E., Bujold, E., Lefebvre, F., Tremblay, Y., Piedboeuf, B., and Canadian Neonatal Network (2012). Role of gender in morbidity and mortality of extremely premature neonates. *American journal of perinatology* 29, 159-166.

Bird, A.D., Choo, Y.L., Hooper, S.B., McDougall, A.R., and Cole, T.J. (2014). Mesenchymal glucocorticoid receptor regulates the development of multiple cell layers of the mouse lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50, 419-428.

Bird, A.D., Flecknoe, S.J., Tan, K.H., Olsson, P.F., Antony, N., Mantamadiotis, T., Mollard, R., Hooper, S.B., and Cole, T.J. (2011). cAMP response element binding protein is required for differentiation of respiratory epithelium during murine development. *PLoS one* 6, e17843.

Biswas, M.G., and Russell, D.W. (1997). Expression cloning and characterization of oxidative 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. *The Journal of biological chemistry* 272, 15959-15966.

Blair, P.S., Platt, M.W., Smith, I.J., Fleming, P.J., and Group, C.S.R. (2006). Sudden infant death syndrome and sleeping position in pre-term and low birth weight infants: an opportunity for targeted intervention. *Archives of disease in childhood* 91, 101-106.

Bogue, C.W., Gross, I., Vasavada, H., Dynia, D.W., Wilson, C.M., and Jacobs, H.C. (1994). Identification of Hox genes in newborn lung and effects of gestational age and retinoic acid on their expression. *The American journal of physiology* 266, L448-454.

Bolt, R.J., van Weissenbruch, M.M., Lafeber, H.N., and Delemarre-van de Wall, H.A. (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr. Pulmonol.* 32, 76-91.

Bose, H.S., Lingappa, V.R., and Miller, W.L. (2002). Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* 417, 87-91.

Bose, H.S., Whittal, R.M., Baldwin, M.A., and Miller, W.L. (1999). The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7250-7255.

**Boucher, E., Provost, P.R., Plante, J., and Tremblay, Y. (2009). Androgen receptor and 17beta-HSD type 2 regulation in neonatal mouse lung development. *Molecular and cellular endocrinology* 311, 109-119.**

**Boucher, E., Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2014). Ontogeny of adrenal-like glucocorticoid synthesis pathway and of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse lung. *BMC research notes* 7, 119.**

**Boucher, E., Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2015). C21-steroids inactivation and glucocorticoid synthesis in the developing lung. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 147, 70-80.**

**Bouhaddioui, W., Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2014). Identification of most stable endogenous control genes for microRNA quantification in the developing mouse lung. *PLoS one* 9, e111855.**

**Bouhaddioui, W., Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2016a). CYP21A2 expression is localized in the developing distal epithelium of the human perinatal lung and is compatible with in situ production and intracrine actions of active glucocorticoids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.**

**Bouhaddioui, W., Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2016b). Expression profile of androgen-modulated microRNAs in the fetal murine lung. *Biology of sex differences* 7, 20.**

Boyerinas, B., Park, S.M., Hau, A., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-related cancer* 17, F19-36.

Breitling, R., Krazeisen, A., Moller, G., and Adamski, J. (2001). 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7--an ancient 3-ketosteroid reductase of cholesterologenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 171, 199-204.

Brereton, P., Suzuki, T., Sasano, H., Li, K., Duarte, C., Obeyesekere, V., Haeseleer, F., Palczewski, K., Smith, I., Komesaroff, P., *et al.* (2001). Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Molecular and cellular endocrinology* 171, 111-117.

**Bresson, E., Seaborn, T., Côté, M., Cormier, G., Provost, P.R., Piedboeuf, B., and Tremblay, Y. (2010). Gene Expression Profile of Androgen Modulated Genes in the Murine Fetal Developing Lung. *Reprod Biol & Endocrinol.* 8 (1):2  
*doi: 10.1186/1477-7827-8-2.***

Bristow, J., Gitelman, S.E., Tee, M.K., Staels, B., and Miller, W.L. (1993). Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". *The Journal of biological chemistry* 268, 12919-12924.

Brown, D., Rahman, M., and Nana-Sinkam, S.P. (2014). MicroRNAs in respiratory disease. A clinician's overview. *Annals of the American Thoracic Society* 11, 1277-1285.

Brown, R.D., Strott, C.A., and Liddle, G.W. (1972). Plasma deoxycorticosterone in normal and abnormal pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 35, 736-742.

Brunnemann, N., Kipp, K.H., Gortner, L., Meng-Hentschel, J., Papanagiotou, P., Reith, W., and Shamdeen, M.G. (2013). Alterations in the relationship between hippocampal volume and episodic memory performance in preterm children. *Developmental neuropsychology* 38, 226-235.

Buch, S., Jones, C., Liu, J., Han, R.N., Tanswell, A.K., and Post, M. (1994). Differential regulation of platelet-derived growth factor genes in fetal rat lung fibroblasts. *Experimental cell research* 211, 142-149.

Bureik, M., Bruck, N., Hubel, K., and Bernhardt, R. (2005). The human mineralocorticoid receptor only partially differentiates between different ligands after expression in fission yeast. *FEMS Yeast Res* 5, 627-633.

Cao, P., Deng, Z., Wan, M., Huang, W., Cramer, S.D., Xu, J., Lei, M., and Sui, G. (2010). MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1alpha/HIF-1beta. *Molecular cancer* 9, 108.

Caradec, J., Sirab, N., Keumeugni, C., Moutereau, S., Chimingqi, M., Matar, C., Revaud, D., Bah, M., Manivet, P., Conti, M., *et al.* (2010). 'Desperate house genes': the dramatic example of hypoxia. *British journal of cancer* 102, 1037-1043.

Caratti, G., Matthews, L., Poolman, T., Kershaw, S., Baxter, M., and Ray, D. (2015). Glucocorticoid receptor function in health and disease. *Clinical endocrinology* 83, 441-448.

Cardoso, W.V., and Lu, J. (2006). Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development* 133, 1611-1624.

Carlo, W.A., McDonald, S.A., Fanaroff, A.A., Vohr, B.R., Stoll, B.J., Ehrenkranz, R.A., Andrews, W.W., Wallace, D., Das, A., Bell, E.F., *et al.* (2011). Association of antenatal corticosteroids with mortality and neurodevelopmental outcomes among infants born at 22 to 25 weeks' gestation. *Jama* 306, 2348-2358.

Carr, B.R., and Simpson, E.R. (1981). De novo synthesis of cholesterol by the human fetal adrenal gland. *Endocrinology* 108, 2154-2162.

Carraro, G., El-Hashash, A., Guidolin, D., Tiozzo, C., Turcatel, G., Young, B.M., De Langhe, S.P., Bellusci, S., Shi, W., Parnigotto, P.P., *et al.* (2009). miR-17 family of microRNAs controls FGF10-mediated embryonic lung epithelial branching morphogenesis

through MAPK14 and STAT3 regulation of E-Cadherin distribution. *Developmental biology* 333, 238-250.

Carraro, G., Shrestha, A., Rostkivius, J., Contreras, A., Chao, C.M., El Agha, E., Mackenzie, B., Dilai, S., Guidolin, D., Taketo, M.M., *et al.* (2014). miR-142-3p balances proliferation and differentiation of mesenchymal cells during lung development. *Development* 141, 1272-1281.

Casey, M.L., and MacDonald, P.C. (1982). Extraadrenal formation of a mineralocorticosteroid: deoxycorticosterone and deoxycorticosterone sulfate biosynthesis and metabolism. *Endocrine reviews* 3, 396-403.

Casey, M.L., Winkel, C.A., and MacDonald, P.C. (1983). Conversion of progesterone to deoxycorticosterone in the human fetus: steroid 21-hydroxylase activity in fetal tissues. *Journal of steroid biochemistry* 18, 449-452.

Cavaille, J., and Bachellerie, J.P. (1998). SnoRNA-guided ribose methylation of rRNA: structural features of the guide RNA duplex influencing the extent of the reaction. *Nucleic acids research* 26, 1576-1587.

Cebra-Thomas, J.A., Bromer, J., Gardner, R., Lam, G.K., Sheipe, H., and Gilbert, S.F. (2003). T-box gene products are required for mesenchymal induction of epithelial branching in the embryonic mouse lung. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 226, 82-90.

Cerutti, H., and Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current genetics* 50, 81-99.

Chang, K.H., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Kerin, M.J., and Miller, N. (2010). MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC cancer* 10, 173.

Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584-589.

Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., *et al.* (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* 33, e179.

Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics* 38, 228-233.

Chen, S.Y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O.C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G.L., Verrey, F., and Pearce, D. (1999). Epithelial sodium channel regulated by



aldosterone-induced protein sgk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 2514-2519.

Chen, Y., Gelfond, J.A., McManus, L.M., and Shireman, P.K. (2009). Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC genomics* *10*, 407.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.

Cheng, C., Fu, X., Alves, P., and Gerstein, M. (2009). mRNA expression profiles show differential regulatory effects of microRNAs between estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer. *Genome biology* *10*, R90.

Chetty, A., Andersson, S., Lassus, P., and Nielsen, H.C. (2004). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor expression in human lung RDS and BPD. *Pediatr. Pulmonol.* *37*, 128-136.

Chetyrkin, S.V., Hu, J., Gough, W.H., Dumaul, N., and Kedishvili, N.Y. (2001). Further characterization of human microsomal 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics* *386*, 1-10.

Choi, C.W., Kim, B.I., Koh, Y.Y., Choi, J.-H., and Choi, J.Y. (2005). Clinical characteristics of chronic lung disease without preceding respiratory distress syndrome in preterm infants. *Pediatrics International* *47*, 72-79.

Chugh, P., and Dittmer, D.P. (2012). Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* *3*, 601-616.

Cima, I., Corazza, N., Dick, B., Fuhrer, A., Herren, S., Jakob, S., Ayuni, E., Mueller, C., and Brunner, T. (2004). Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *The Journal of experimental medicine* *200*, 1635-1646.

Close, D.A., Yun, S.S., McCormick, S.D., Wildbill, A.J., and Li, W. (2010). 11-deoxycortisol is a corticosteroid hormone in the lamprey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 13942-13947.

Cnattingius, S. (2004). The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* *6 Suppl 2*, S125-140.

Cnattingius, S., Villamor, E., Johansson, S., Edstedt Bonamy, A.K., Persson, M., Wikstrom, A.K., and Granath, F. (2013). Maternal obesity and risk of preterm delivery. *Jama* *309*, 2362-2370.

Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., and Schutz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & development* 9, 1608-1621.

Cole, T.J., Solomon, N.M., Van Driel, R., Monk, J.A., Bird, D., Richardson, S.J., Dilley, R.J., and Hooper, S.B. (2004). Altered epithelial cell proportions in the fetal lung of glucocorticoid receptor null mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30, 613-619.

Crowther, C.A., McKinlay, C.J., Middleton, P., and Harding, J.E. (2015). Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for improving neonatal health outcomes. *The Cochrane database of systematic reviews* 7, CD003935.

Dagenais, A., Kothary, R., and Berthiaume, Y. (1997). The alpha subunit of the epithelial sodium channel in the mouse: developmental regulation of its expression. *Pediatric research* 42, 327-334.

Dallman, M.F., Strack, A.M., Akana, S.F., Bradbury, M.J., Hanson, E.S., Scribner, K.A., and Smith, M. (1993). Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Frontiers in neuroendocrinology* 14, 303-347.

Dammann, C.E., Nielsen, H.C., and Carraway III, K.L. (2003). Role of neuregulin-1 beta in the developing lung. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 167, 1711-1716.

Daniels, C.B., and Orgeig, S. (2003). Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 18, 151-157.

Darlow, B.A., Hutchinson, J.L., Simpson, J.M., Henderson-Smart, D.J., Donoghue, D.A., and Evans, N.J. (2005). Variation in rates of severe retinopathy of prematurity among neonatal intensive care units in the Australian and New Zealand Neonatal Network. *The British journal of ophthalmology* 89, 1592-1596.

Davoren, P.A., McNeill, R.E., Lowery, A.J., Kerin, M.J., and Miller, N. (2008). Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC molecular biology* 9, 76.

De Spiegelare, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., Nettersheim, D., Bergmann, M., Brehm, R., Kliesch, S., Vandekerckhove, L., *et al.* (2015). Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS one* 10, e0122515.

Deakins, K.M. (2009). Bronchopulmonary dysplasia. *Respiratory care* 54, 1252-1262.

Delacourt, C., Jarreau, P.H., and Bourbon, J. (2003). [Normal and abnormal alveolar development]. *Revue des maladies respiratoires* 20, 373-383.

Delic, D., Grosser, C., Dkhil, M., Al-Quraishy, S., and Wunderlich, F. (2010). Testosterone-induced upregulation of miRNAs in the female mouse liver. *Steroids* 75, 998-1004.

Dey, B.K., Mueller, A.C., and Dutta, A. (2014). Long non-coding RNAs as emerging regulators of differentiation, development, and disease. *Transcription* 5, e944014.

Deyashiki, Y., Ogasawara, A., Nakayama, T., Nakanishi, M., Miyabe, Y., Sato, K., and Hara, A. (1994). Molecular cloning of two human liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase isoenzymes that are identical with chlordecone reductase and bile-acid binder. *The Biochemical journal* 299 ( Pt 2), 545-552.

Dong, J., Carey, W.A., Abel, S., Collura, C., Jiang, G., Tomaszek, S., Sutor, S., Roden, A.C., Asmann, Y.W., Prakash, Y.S., *et al.* (2012). MicroRNA-mRNA interactions in a murine model of hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia. *BMC genomics* 13, 204.

Dong, J., Jiang, G., Asmann, Y.W., Tomaszek, S., Jen, J., Kislinger, T., and Wigle, D.A. (2010). MicroRNA networks in mouse lung organogenesis. *PLoS one* 5, e10854.

Dufort, I., Rheault, P., Huang, X.F., Soucy, P., and Luu-The, V. (1999). Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140, 568-574.

Ehrenkranz, R.A., Walsh, M.C., Vohr, B.R., Jobe, A.H., Wright, L.L., Fanaroff, A.A., Wraga, L.A., Poole, K., National Institutes of Child, H., and Human Development Neonatal Research, N. (2005). Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 116, 1353-1360.

Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., *et al.* (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism* 3, 87-98.

Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology* 19, 586-593.

Faggad, A., Budczies, J., Tchernitsa, O., Darb-Esfahani, S., Sehouli, J., Muller, B.M., Wirtz, R., Chekerov, R., Weichert, W., Sinn, B., *et al.* (2010). Prognostic significance of Dicer expression in ovarian cancer-link to global microRNA changes and oestrogen receptor expression. *The Journal of pathology* 220, 382-391.

Farstad, T., Bratlid, D., Medbo, S., Markestad, T., and Group, T.N.E.P.S. (2011). Bronchopulmonary dysplasia- prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants. *Acta Paediatr.* 100, 53-58.

Feldman, D.M., Carbone, J., Belden, L., Borgida, A.F., and Herson, V. (2007). Betamethasone vs dexamethasone for the prevention of morbidity in very-low-birthweight neonates. *American journal of obstetrics and gynecology* 197, 284 e281-284.

Finnegan, E.J., and Matzke, M.A. (2003). The small RNA world. *Journal of cell science* 116, 4689-4693.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Floros, J., Post, M., and Smith, B.T. (1985). Glucocorticoids affect the synthesis of pulmonary fibroblast-pneumonocyte factor at a pretranslational level. *J. Biol. Chem.* 260, 2265-2267.

Fomitcheva, J., Baker, M.E., Anderson, E., Lee, G.Y., and Aziz, N. (1998). Characterization of Ke 6, a new 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. *The Journal of biological chemistry* 273, 22664-22671.

Frederiksen, D.W., and Wilson, J.D. (1971). Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: delta 4-3-ketosteroid 5 alpha-oxidoreductase of rat prostate. *The Journal of biological chemistry* 246, 2584-2593.

Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19, 92-105.

Garbrecht, M.R., Klein, J.M., McCarthy, T.A., Schmidt, T.J., Krozowski, Z.S., and Snyder, J.M. (2007). 11-Beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human adult and fetal lung and its regulation by sex steroids. *Pediatric research* 62, 26-31.

Garbrecht, M.R., Klein, J.M., Schmidt, T.J., and Snyder, J.M. (2006). Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: implications for lung development and the pulmonary surfactant system. *Biology of the neonate* 89, 109-119.

Geissler, W.M., Davis, D.L., Wu, L., Bradshaw, K.D., Patel, S., Mendonca, B.B., Elliston, K.O., Wilson, J.D., Russell, D.W., and Andersson, S. (1994). Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nature genetics* 7, 34-39.

Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P., and Caldas, C. (2010). Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *Rna* 16, 991-1006.

Gomes, L.G., Huang, N., Agrawal, V., Mendonca, B.B., Bachega, T.A., and Miller, W.L. (2009). Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94, 89-95.

Greene, C.M., and Gaughan, K.P. (2013). microRNAs in asthma: potential therapeutic targets. *Current opinion in pulmonary medicine* 19, 66-72.

Grenache, D.G., and Gronowski, A.M. (2006). Fetal lung maturity. *Clin Biochem* 39, 1-10.

Grier, D.G., and Halliday, H.L. (2004). Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development. *Treatments in respiratory medicine* 3, 295-306.

Grosshans, H., and Slack, F.J. (2002). Micro-RNAs: small is plentiful. *The Journal of cell biology* 156, 17-21.

Gwynne, J.T., and Strauss, J.F., 3rd (1982). The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocrine reviews* 3, 299-329.

Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 509-524.

Haagsman, H.P., and Diemel, R.V. (2001). Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 129, 91-108.

Habermehl, D., Parkitna, J.R., Kaden, S., Brugger, B., Wieland, F., Grone, H.J., and Schutz, G. (2011). Glucocorticoid activity during lung maturation is essential in mesenchymal and less in alveolar epithelial cells. *Molecular endocrinology* 25, 1280-1288.

Hafner, M., Lianoglou, S., Tuschl, T., and Betel, D. (2012). Genome-wide identification of miRNA targets by PAR-CLIP. *Methods* 58, 94-105.

Hamon, I., and Hascoet, J.M. (2001). [Perinatal corticotherapy: updates]. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 30, S50-53.

Hamrick, S.E., and Hansmann, G. (2010). Patent ductus arteriosus of the preterm infant. *Pediatrics* 125, 1020-1030.

Han, F., Ozawa, H., Matsuda, K., Nishi, M., and Kawata, M. (2005). Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience research* 51, 371-381.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.

Harris, K.S., Zhang, Z., McManus, M.T., Harfe, B.D., and Sun, X. (2006). Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 2208-2213.

He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics* *5*, 522-531.

He, M., Xu, Z., Ding, T., Kuang, D.M., and Zheng, L. (2009). MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. *Cellular & molecular immunology* *6*, 343-352.

Hellal-Levy, C., Couette, B., Fagart, J., Souque, A., Gomez-Sanchez, C., and Rafestin-Oblin, M. (1999). Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS letters* *464*, 9-13.

Helsen, C., Van den Broeck, T., Voet, A., Prekovic, S., Van Poppel, H., Joniau, S., and Claessens, F. (2014). Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *Endocrine-related cancer* *21*, T105-118.

Henderson-Smart, D.J., and Steer, P. (2001). Methylxanthine treatment for apnea in preterm infants. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD000140.

Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C.G., Fehr, C., Junemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal* *27*, 3300-3310.

Hermansen, C.L., and Lorah, K.N. (2007). Respiratory distress in the newborn. *American family physician* *76*, 987-994.

Herriges, M., and Morrisey, E.E. (2014). Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* *141*, 502-513.

Himpens, E., Van den Broeck, C., Oostra, A., Calders, P., and Vanhaesebrouck, P. (2008). Prevalence, type, distribution, and severity of cerebral palsy in relation to gestational age: a meta-analytic review. *Developmental medicine and child neurology* *50*, 334-340.

Hirasawa, G., Sasano, H., Suzuki, T., Takeyama, J., Muramatu, Y., Fukushima, K., Hiwatashi, N., Toyota, T., Nagura, H., and Krozowski, Z.S. (1999). 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *84*, 1453-1458.

Holmgren, P.A., and Hogberg, U. (2001). The very preterm infant - a population-based study. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* *80*, 525-531.

Horne, R.S. (2006). Effects of prematurity on heart rate control: implications for sudden infant death syndrome. *Expert review of cardiovascular therapy* 4, 335-343.

Hu, M.C., Hsu, N.C., El Hadj, N.B., Pai, C.I., Chu, H.P., Wang, C.K., and Chung, B.C. (2002). Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of *Cyp11a1*. *Molecular endocrinology* 16, 1943-1950.

Huang, L., Yan, H., Jiang, X., Yin, G., Zhang, X., Qi, X., Zhang, Y., Yan, Y., Ma, X., and Peng, Y. (2014). Identification of Candidate Reference Genes in Perennial Ryegrass for Quantitative RT-PCR under Various Abiotic Stress Conditions. *PLoS one* 9, e93724.

Huang, X.F., and Luu-The, V. (2000). Molecular characterization of a first human 3( $\alpha$ -> $\beta$ )-hydroxysteroid epimerase. *The Journal of biological chemistry* 275, 29452-29457.

Hubert, C., Gasc, J.M., Berger, S., Schutz, G., and Corvol, P. (1999). Effects of mineralocorticoid receptor gene disruption on the components of the renin-angiotensin system in 8-day-old mice. *Molecular endocrinology* 13, 297-306.

Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *The Journal of cell biology* 148, 567-578.

Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R., and Rossier, B.C. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nature genetics* 12, 325-328.

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16961-16966.

Hundertmark, S., Dill, A., Ebert, A., Zimmermann, B., Kotelevtsev, Y.V., Mullins, J.J., and Seckl, J.R. (2002). Foetal Lung Maturation in 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Knockout Mice. *Horm. Metab. Res.* 34, 545-549.

Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.

Ito, T., Udaka, N., Yazawa, T., Okudela, K., Hayashi, H., Sudo, T., Guillemot, F., Kageyama, R., and Kitamura, H. (2000). Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development* 127, 3913-3921.

Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., and Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular cell* 39, 292-299.

Jain, D., and Bancalari, E. (2014). Bronchopulmonary dysplasia: clinical perspective. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 100, 134-144.

Jensen, E.A., and Schmidt, B. (2014). Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 100, 145-157.

Jiang, Q., Wang, F., Li, M.Y., Ma, J., Tan, G.F., and Xiong, A.S. (2014). Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses in *Oenanthе javanica* (Bl.) DC. *PLoS one* 9, e92262.

Jobe, A.H., and Bancalari, E. (2001). Bronchopulmonary dysplasia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 163, 1723-1729.

Johar, D., Siragam, V., Mahood, T.H., and Keijzer, R. (2015). New insights into lung development and diseases: the role of microRNAs. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 93, 139-148.

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.

Jovanovic, M., and Hengartner, M.O. (2006). miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 25, 6176-6187.

Jung, C., Ho, J.T., Torpy, D.J., Rogers, A., Doogue, M., Lewis, J.G., Czajko, R.J., and Inder, W.J. (2011). A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, 1533-1540.

Kenouch, S., Lombes, M., Delahaye, F., Eugene, E., Bonvalet, J.P., and Farman, N. (1994). Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 79, 1334-1341.

Kheirleiseid, E.A., Chang, K.H., Newell, J., Kerin, M.J., and Miller, N. (2010). Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC molecular biology* 11, 12.

Kim, C.J., Lin, L., Huang, N., Quigley, C.A., AvRuskin, T.W., Achermann, J.C., and Miller, W.L. (2008). Severe combined adrenal and gonadal deficiency caused by novel mutations in the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93, 696-702.



Kim, N., and Vu, T.H. (2006). Parabronchial smooth muscle cells and alveolar myofibroblasts in lung development. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 78, 80-89.

King, G., Maker, G.L., Berryman, D., Trengove, R.D., and Cake, M.H. (2014). Role of neuregulin-1beta in dexamethasone-enhanced surfactant synthesis in fetal type II cells. *FEBS letters* 588, 975-980.

Kiss, T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109, 145-148.

Kitraki, E., Kittas, C., and Stylianopoulou, F. (1997). Glucocorticoid receptor gene expression during rat embryogenesis. An in situ hybridization study. *Differentiation; research in biological diversity* 62, 21-31.

Kolla, V., Gonzales, L.W., Gonzales, J., Wang, P., Angampalli, S., Feinstein, S.I., and Ballard, P.L. (2007). Thyroid transcription factor in differentiating type II cells: regulation, isoforms, and target genes. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36, 213-225.

Koturbash, I., Zemp, F., Kolb, B., and Kovalchuk, O. (2011). Sex-specific radiation-induced microRNAome responses in the hippocampus, cerebellum and frontal cortex in a mouse model. *Mutation research* 722, 114-118.

Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research* 39, D152-157.

Kozuki, N., Lee, A.C., Silveira, M.F., Sania, A., Vogel, J.P., Adair, L., Barros, F., Caulfield, L.E., Christian, P., Fawzi, W., *et al.* (2013). The associations of parity and maternal age with small-for-gestational-age, preterm, and neonatal and infant mortality: a meta-analysis. *BMC public health* 13 Suppl 3, S2.

Krozowski, Z., and Funder, J.W. (1981). Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology* 109, 1811-1813.

Krozowski, Z.S., Rundle, S.E., Wallace, C., Castell, M.J., Shen, J.H., Dowling, J., Funder, J.W., and Smith, A.I. (1989). Immunolocalization of renal mineralocorticoid receptors with an antiserum against a peptide deduced from the complementary deoxyribonucleic acid sequence. *Endocrinology* 125, 192-198.

Kwak, P.B., and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature structural & molecular biology* 19, 145-151.

Labrie, F. (2015a). Combined blockade of testicular and locally made androgens in prostate cancer: a highly significant medical progress based upon intracrinology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 145, 144-156.

Labrie, F. (2015b). Intracrinology in action: importance of extragonadal sex steroid biosynthesis and inactivation in peripheral tissues in both women and men. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *145*, 131-132.

Lacapere, J.J., and Papadopoulos, V. (2003). Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* *68*, 569-585.

Lachance, Y., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Dumont, M., de Launoit, Y., Guerin, S., Leblanc, G., and Labrie, F. (1990). Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* *265*, 20469-20475.

Lagercrantz, H. (1995). Improved understanding of respiratory control--implications for the treatment of apnoea. *European journal of pediatrics* *154*, S10-12.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853-858.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *Rna* *9*, 175-179.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB* *12*, 735-739.

Laing, A.F., Lowell, S., and Brickman, J.M. (2015). Gro/TLE enables embryonic stem cell differentiation by repressing pluripotent gene expression. *Developmental biology* *397*, 56-66.

Lam, E.W., Shah, K., and Brosens, J.J. (2012). The diversity of sex steroid action: the role of micro-RNAs and FOXO transcription factors in cycling endometrium and cancer. *The Journal of endocrinology* *212*, 13-25.

Lardizabal, M.N., Nocito, A.L., Daniele, S.M., Ornella, L.A., Palatnik, J.F., and Veggi, L.M. (2012). Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS one* *7*, e36323.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 858-862.

Le Menuet, D., Viengchareun, S., Penfornis, P., Walker, F., Zennaro, M.C., and Lombes, M. (2000). Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* *275*, 7878-7886.

Lecellier, C.H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A., and Voinnet, O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308, 557-560.

Lechner, O., Wieggers, G.J., Oliveira-Dos-Santos, A.J., Dietrich, H., Recheis, H., Waterman, M., Boyd, R., and Wick, G. (2000). Glucocorticoid production in the murine thymus. *European journal of immunology* 30, 337-346.

Lee-Robichaud, P., Wright, J.N., Akhtar, M.E., and Akhtar, M. (1995). Modulation of the activity of human 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) by cytochrome b5: endocrinological and mechanistic implications. *The Biochemical journal* 308 ( Pt 3), 901-908.

Lee, H.H. (2014). Mutational analysis of CYP21A2 gene and CYP21A1P pseudogene: long-range PCR on genomic DNA. *Methods in molecular biology* 1167, 275-287.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

Lefever, S., Hellemans, J., Pattyn, F., Przybylski, D.R., Taylor, C., Geurts, R., Untergasser, A., Vandesompele, J., and consortium, R. (2009). RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic acids research* 37, 2065-2069.

Levesque, B.M., Vosatka, R.J., and Nielsen, H.C. (2000). Dihydrotestosterone stimulates branching morphogenesis, cell proliferation, and programmed cell death in mouse embryonic lung explants. *Pediatric research* 47, 481-491.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.

Li, A., Hardy, R., Stoner, S., Tuckermann, J., Seibel, M., and Zhou, H. (2013). Deletion of mesenchymal glucocorticoid receptor attenuates embryonic lung development and abdominal wall closure. *PloS one* 8, e63578.

Li, J., and Wang, C.Y. (2008). TBL1-TBLR1 and beta-catenin recruit each other to Wnt target-gene promoter for transcription activation and oncogenesis. *Nature cell biology* 10, 160-169.

Liang, R., Bates, D.J., and Wang, E. (2009). Epigenetic Control of MicroRNA Expression and Aging. *Current genomics* 10, 184-193.

Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., and Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 17, 62-70.

Liggins, G.C. (1968). Premature parturition after infusion of corticotrophin or cortisol into foetal lambs. *The Journal of endocrinology* *42*, 323-329.

Liggins, G.C. (1969). Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *The Journal of endocrinology* *45*, 515-523.

Liggins, G.C., and Howie, R.N. (1972). A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* *50*, 515-525.

Lin, H.K., Jez, J.M., Schlegel, B.P., Peehl, D.M., Pachter, J.A., and Penning, T.M. (1997). Expression and characterization of recombinant type 2 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) from human prostate: demonstration of bifunctional 3 alpha/17 beta-HSD activity and cellular distribution. *Molecular endocrinology* *11*, 1971-1984.

Lin, S.L., Chiang, A., Chang, D., and Ying, S.Y. (2008). Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *Rna* *14*, 417-424.

Litingtung, Y., Lei, L., Westphal, H., and Chiang, C. (1998). Sonic hedgehog is essential for foregut development. *Nature genetics* *20*, 58-61.

Liu, J., Ye, X., and Wu, F.X. (2013). Characterizing dynamic regulatory programs in mouse lung development and their potential association with tumorigenesis via miRNA-TF-mRNA circuits. *BMC systems biology* *7 Suppl 2*, S11.

Liu, N., Okamura, K., Tyler, D.M., Phillips, M.D., Chung, W.J., and Lai, E.C. (2008). The evolution and functional diversification of animal microRNA genes. *Cell research* *18*, 985-996.

Liu, W., Wang, J., Sauter, N.K., and Pearce, D. (1995). Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 12480-12484.

Lorence, M.C., Corbin, C.J., Kamimura, N., Mahendroo, M.S., and Mason, J.I. (1990). Structural analysis of the gene encoding human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5----4-isomerase. *Molecular endocrinology* *4*, 1850-1855.

Lu, J., Qian, J., Chen, F., Tang, X., Li, C., and Cardoso, W.V. (2005). Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* *334*, 319-323.

Lu, N.Z., Wardell, S.E., Burnstein, K.L., Defranco, D., Fuller, P.J., Giguere, V., Hochberg, R.B., McKay, L., Renoir, J.M., Weigel, N.L., *et al.* (2006). International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacological reviews* *58*, 782-797.

Lu, Y., Okubo, T., Rawlins, E., and Hogan, B.L. (2008). Epithelial progenitor cells of the embryonic lung and the role of microRNAs in their proliferation. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5, 300-304.

Lu, Y., Thomson, J.M., Wong, H.Y., Hammond, S.M., and Hogan, B.L. (2007). Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Developmental biology* 310, 442-453.

Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.

Luo, Z.C., Wilkins, R., Kramer, M.S., Fetal, and Infant Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance, S. (2006). Effect of neighbourhood income and maternal education on birth outcomes: a population-based study. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 174, 1415-1420.

Luu-The, V., Tremblay, P., and Labrie, F. (2006). Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Molecular endocrinology* 20, 437-443.

Luu-The, V., Zhang, Y., Poirier, D., and Labrie, F. (1995). Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 55, 581-587.

MacKenzie, S.M., Clark, C.J., Ingram, M.C., Lai, M., Seckl, J., Gomez-Sanchez, C.E., Fraser, R., Connell, J.M., and Davies, E. (2000). Corticosteroid production by fetal rat hippocampal neurons. *Endocrine research* 26, 531-535.

MacRae, I.J., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature structural & molecular biology* 14, 934-940.

Maeda, Y., Hunter, T.C., Loudy, D.E., Dave, V., Schreiber, V., and Whitsett, J.A. (2006). PARP-2 interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-B. *The Journal of biological chemistry* 281, 9600-9606.

Malpel, S., Mendelsohn, C., and Cardoso, W.V. (2000). Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127, 3057-3067.

Manwani, N., Gagnon, S., Post, M., Joza, S., Muglia, L., Cornejo, S., Kaplan, F., and Sweezey, N.B. (2010). Reduced viability of mice with lung epithelial-specific knockout of glucocorticoid receptor. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 43, 599-606.

Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L.E., Cibois, M., Robbe-Sermesant, K., Jolly, T., Cardinaud, B., Moreilhon, C., *et al.* (2011). Control of vertebrate

multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature cell biology* 13, 693-699.

Marco, A., Kozomara, A., Hui, J.H., Emery, A.M., Rollinson, D., Griffiths-Jones, S., and Ronshaugen, M. (2013). Sex-biased expression of microRNAs in *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2402.

Marijanovic, Z., Laubner, D., Moller, G., Gege, C., Husen, B., Adamski, J., and Breitling, R. (2003). Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis. *Molecular endocrinology* 17, 1715-1725.

Martinerie, L., Munier, M., Le Menuet, D., Meduri, G., Viengchareun, S., and Lombes, M. (2013). The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie* 95, 148-157.

Matouskova, P., Bartikova, H., Bousova, I., Hanusova, V., Szotakova, B., and Skalova, L. (2014). Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs in mouse model of obesity. *PloS one* 9, e86033.

McCartney, J., Richards, E.M., Wood, C.E., and Keller-Wood, M. (2014). Mineralocorticoid effects in the late gestation ovine fetal lung. *Physiol Rep* 2, e12066, doi: 12010.14814/phy12062.12066.

McGuire, W., and Fowlie, P.W. (2005). *ABC of preterm birth* (Malden, Mass.: BMJ Books/Blackwell Pub.).

McKiernan, P.J., and Greene, C.M. (2015). MicroRNA Dysregulation in Cystic Fibrosis. *Mediators of inflammation* 2015, 529642.

McKinlay, C.J., Crowther, C.A., Middleton, P., and Harding, J.E. (2012). Repeat antenatal glucocorticoids for women at risk of preterm birth: a Cochrane Systematic Review. *American journal of obstetrics and gynecology* 206, 187-194.

McKinnon, B., Yang, S., Kramer, M.S., Bushnik, T., Sheppard, A.J., and Kaufman, J.S. (2016). Comparison of black-white disparities in preterm birth between Canada and the United States. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 188, E19-26.

Medh, R.D., Lay, R.H., and Schmidt, T.J. (1998). Agonist-specific modulation of glucocorticoid receptor-mediated transcription by immunosuppressants. *Molecular and cellular endocrinology* 138, 11-23.

Mellon, S.H., and Miller, W.L. (1989). Extraadrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated by P450c21. *The Journal of clinical investigation* 84, 1497-1502.

Mendelsohn, C., Lohnes, D., Decimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P., and Mark, M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* *120*, 2749-2771.

Mestdagh, P., Hartmann, N., Baeriswyl, L., Andreasen, D., Bernard, N., Chen, C., Cheo, D., D'Andrade, P., DeMayo, M., Dennis, L., *et al.* (2014). Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nature methods* *11*, 809-815.

Miller, W.L. (2005). Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* *146*, 2544-2550.

Miller, W.L., and Auchus, R.J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews* *32*, 81-151.

Min, H., Danilenko, D.M., Scully, S.A., Bolon, B., Ring, B.D., Tarpley, J.E., DeRose, M., and Simonet, W.S. (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes & development* *12*, 3156-3161.

Morel, Y., Bristow, J., Gitelman, S.E., and Miller, W.L. (1989). Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 6582-6586.

Moriette, G., Lescure, S., El Ayoubi, M., and Lopez, E. (2010). [Apnea of prematurity: what's new?]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* *17*, 186-190.

Mortality, G.B.D., and Causes of Death, C. (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* *385*, 117-171.

Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development* *16*, 720-728.

Muglia, L.J., Bae, D.S., Brown, T.T., Vogt, S.K., Alvarez, J.G., Sunday, M.E., and Majzoub, J.A. (1999). Proliferation and differentiation defects during lung development in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* *20*, 181-188.

Mujahid, S., Bergholz, T.M., Oliver, H.F., Boor, K.J., and Wiedmann, M. (2013a). Correction: Wiedmann, M., et al. Exploration of the Role of the Non-Coding RNA SbrE in *L. monocytogenes* Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 378-393. *International journal of molecular sciences* *14*, 9685.

Mujahid, S., Nielsen, H.C., and Volpe, M.V. (2013b). MiR-221 and miR-130a regulate lung airway and vascular development. *PLoS one* 8, e55911.

Murphy, K.E., Hannah, M.E., Willan, A.R., Hewson, S.A., Ohlsson, A., Kelly, E.N., Matthews, S.G., Saigal, S., Asztalos, E., Ross, S., *et al.* (2008). Multiple courses of antenatal corticosteroids for preterm birth (MACS): a randomised controlled trial. *Lancet* 372, 2143-2151.

Nahoul, K., Daffos, F., Forestier, F., Chartier, M., and Scholler, R. (1988). Plasma corticosteroid patterns in the fetus. *Journal of steroid biochemistry* 29, 635-640.

Navarro, A., Marrades, R.M., Vinolas, N., Quera, A., Agusti, C., Huerta, A., Ramirez, J., Torres, A., and Monzo, M. (2009). MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis. *Oncology* 76, 162-169.

Nielsen, H.C. (1985). Androgen receptors influence the production of pulmonary surfactant in the testicular feminization mouse fetus. *J. Clin. Invest.* 76, 177-181.

Nielsen, H.C. (1986). The development of surfactant synthesis in fetal rabbit lung organ culture exhibits a sex dimorphism. *Biochim. Biophys. Acta* 883, 373-379.

Nielsen, H.C., and Torday, J.S. (1981). Sex differences in fetal rabbit pulmonary surfactant. *Pediatr. Res.* 15, 1245-1247.

Nielsen, H.C., Zinman, H.M., and Torday, J.S. (1982). Dihydrotestosterone inhibits fetal rabbit pulmonary surfactant production. *The Journal of clinical investigation* 69, 611-616.

Nixon, M., Upreti, R., and Andrew, R. (2012). 5 $\alpha$ -Reduced glucocorticoids: a story of natural selection. *The Journal of endocrinology* 212, 111-127.

Nokelainen, P., Peltoketo, H., Vihko, R., and Vihko, P. (1998). Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat. *Molecular endocrinology* 12, 1048-1059.

Northway, W.H., Jr., Rosan, R.C., and Porter, D.Y. (1967). Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *The New England journal of medicine* 276, 357-368.

O'Brodovich, H.M. (1996). Immature epithelial Na<sup>+</sup> channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome. *Proceedings of the Association of American Physicians* 108, 345-355.

Oglesby, I.K., McElvaney, N.G., and Greene, C.M. (2010). MicroRNAs in inflammatory lung disease--master regulators or target practice? *Respiratory research* 11, 148.



Olave, N., Lal, C.V., Halloran, B., Pandit, K., Cuna, A.C., Faye-Petersen, O.M., Kelly, D.R., Nicola, T., Benos, P., Kaminski, N., *et al.* (2015). Regulation of Alveolar Septation by MicroRNA-489. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, *ajplung* 00145 02015.

Orom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular cell* *30*, 460-471.

Ouvrard-Pascaud, A., Sainte-Marie, Y., Benitah, J.P., Perrier, R., Soukaseum, C., Nguyen Dinh Cat, A., Royer, A., Le Quang, K., Charpentier, F., Demolombe, S., *et al.* (2005). Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation* *111*, 3025-3033.

Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development* *22*, 3172-3183.

Pais, R.S., Moreno-Barriuso, N., Hernandez-Porras, I., Lopez, I.P., De Las Rivas, J., and Pichel, J.G. (2013). Transcriptome analysis in prenatal IGF1-deficient mice identifies molecular pathways and target genes involved in distal lung differentiation. *PLoS one* *8*, e83028.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Muller, P., *et al.* (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* *408*, 86-89.

Patel, R., Williams-Dautovich, J., and Cummins, C.L. (2014). Minireview: new molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues. *Molecular endocrinology* *28*, 999-1011.

Pazirandeh, A., Xue, Y., Rafter, I., Sjövall, J., Jondal, M., and Okret, S. (1999). Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *FASEB J.* *13*, 893-901.

Pearce, D., Verrey, F., Chen, S.Y., Mastroberardino, L., Meijer, O.C., Wang, J., and Bhargava, A. (2000). Role of SGK in mineralocorticoid-regulated sodium transport. *Kidney Int* *57*, 1283-1289.

Pelletier, G. (2000). Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histology and histopathology* *15*, 1261-1270.

Peltier, H.J., and Latham, G.J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *Rna* *14*, 844-852.

Peltoketo, H., Luu-The, V., Simard, J., and Adamski, J. (1999). 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *Journal of molecular endocrinology* *23*, 1-11.

Pepicelli, C.V., Lewis, P.M., and McMahon, A.P. (1998). Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Current biology : CB* *8*, 1083-1086.

Perez-Gil, J., and Weaver, T.E. (2010). Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology* *25*, 132-141.

Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell* *21*, 533-542.

Pezzi, V., Mathis, J.M., Rainey, W.E., and Carr, B.R. (2003). Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *87*, 181-189.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* *26*, 509-515.

Phillips, J.B., Abbot, P., and Rokas, A. (2015). Is preterm birth a human-specific syndrome? *Evolution, medicine, and public health* *2015*, 136-148.

Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573-1576.

Pippal, J.B., and Fuller, P.J. (2008). Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *Journal of molecular endocrinology* *41*, 405-413.

**Plante, J., Simard, M., Rantakari, P., Cote, M., Provost, P.R., Poutanen, M., and Tremblay, Y. (2009). Epithelial cells are the major site of hydroxysteroid (17 $\beta$ ) dehydrogenase 2 and androgen receptor expression in fetal mouse lungs during the period overlapping the surge of surfactant. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *117*, 139-145.**

Poets, C.F. (2010). Apnea of prematurity: What can observational studies tell us about pathophysiology? *Sleep medicine* *11*, 701-707.

Polikepahad, S., Knight, J.M., Naghavi, A.O., Oplt, T., Creighton, C.J., Shaw, C., Benham, A.L., Kim, J., Soibam, B., Harris, R.A., *et al.* (2010). Proinflammatory role for let-7 microRNAs in experimental asthma. *The Journal of biological chemistry* *285*, 30139-30149.

Pollak, A., and Birnbacher, R. (2004). Preterm male infants need more initial respiratory support than female infants. *Acta paediatrica* *93*, 447-448.

Pongracz, J.E., and Stockley, R.A. (2006). Wnt signalling in lung development and diseases. *Respiratory research* *7*, 15.

Post, M., Floros, J., and Smith, B.T. (1984). Inhibition of lung maturation by monoclonal antibodies against fibroblast-pneumonocyte factor. *Nature* *308*, 284-286.

Pressley, L., and Funder, J.W. (1975). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in gut mucosa. *Endocrinology* *97*, 588-596.

**Provost, P.R., Blomquist, C.H., Drolet, R., Flamand, N., and Tremblay, Y. (2002). Androgen inactivation in human lung fibroblasts: variations in levels of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 5 alpha-reductase activity compatible with androgen inactivation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *87*, 3883-3892.**

**Provost, P.R., Blomquist, C.H., Godin, C., Huang, X.F., Flamand, N., Luu-The, V., Nadeau, D., and Tremblay, Y. (2000). Androgen formation and metabolism in the pulmonary epithelial cell line A549: expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type 3. *Endocrinology* *141*, 2786-2794.**

**Provost, P.R., Boucher, E., and Tremblay, Y. (2013). Glucocorticoid metabolism in the developing lung: adrenal-like synthesis pathway. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *138*, 72-80.**

**Provost, P.R., Simard, M., and Tremblay, Y. (2004). A link between lung androgen metabolism and the emergence of mature epithelial type II cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* *170*, 296-305.**

**Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2005). Genes involved in the adrenal pathway of glucocorticoid synthesis are transiently expressed in the developing lung. *Endocrinology* *146*, 2239-2245.**

**Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2007). Mouse 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA: a marker of lung maturity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *103*, 61-64.**

Pryhuber, G.S., Hull, W.M., Fink, I., McMahan, M.J., and Whitsett, J.A. (1991). Ontogeny of surfactant proteins A and B in human amniotic fluid as indices of fetal lung maturity. *Pediatric research* *30*, 597-605.

Pujols, L., Mullol, J., Torrego, A., and Picado, C. (2004). Glucocorticoid receptors in human airways. *Allergy* *59*, 1042-1052.

Rainer, J., Ploner, C., Jesacher, S., Ploner, A., Eduardoff, M., Mansha, M., Wasim, M., Panzer-Grumayer, R., Trajanoski, Z., Niederegger, H., *et al.* (2009). Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 23, 746-752.

Ramanathan, R. (2009). Choosing a right surfactant for respiratory distress syndrome treatment. *Neonatology* 95, 1-5.

Raval, M.V., and Moss, R.L. (2014). Current concepts in the surgical approach to necrotizing enterocolitis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 21, 105-110.

Redshaw, N., Wilkes, T., Whale, A., Cowen, S., Huggett, J., and Foy, C.A. (2013). A comparison of miRNA isolation and RT-qPCR technologies and their effects on quantification accuracy and repeatability. *BioTechniques* 54, 155-164.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.

Reveret, M., Boivin, A., Guignonis, V., Audibert, F., and Nuyt, A.M. (2015). Preeclampsia: effect on newborn blood pressure in the 3 days following preterm birth: a cohort study. *Journal of human hypertension* 29, 115-121.

Rheaume, E., Lachance, Y., Zhao, H.F., Breton, N., Dumont, M., de Launoit, Y., Trudel, C., Luu-The, V., Simard, J., and Labrie, F. (1991). Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Molecular endocrinology* 5, 1147-1157.

Ribas, J., Ni, X., Haffner, M., Wentzel, E.A., Salmasi, A.H., Chowdhury, W.H., Kudrolli, T.A., Yegnasubramanian, S., Luo, J., Rodriguez, R., *et al.* (2009). miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer research* 69, 7165-7169.

Riepe, F.G., Tatzel, S., Sippell, W.G., Pleiss, J., and Krone, N. (2005). Congenital adrenal hyperplasia: the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency in H-2<sup>aw18</sup> mice. *Endocrinology* 146, 2563-2574.

Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic acids research* 35, 5944-5953.

Roberts, D., and Dalziel, S. (2006). Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD004454.

Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83-86.

Rupprecht, R., Reul, J.M., van Steensel, B., Spengler, D., Soder, M., Berning, B., Holsboer, F., and Damm, K. (1993). Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *European journal of pharmacology* 247, 145-154.

Saaltink, D.J., and Vreugdenhil, E. (2014). Stress, glucocorticoid receptors, and adult neurogenesis: a balance between excitation and inhibition? *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 71, 2499-2515.

Sahin, A., Sahin, M., Turkcu, F.M., Cingu, A.K., Yuksel, H., Cinar, Y., Ari, S., and Caca, I. (2014). Incidence of retinopathy of prematurity in extremely premature infants. *ISRN pediatrics* 2014, 134347.

Sangkomkamhang, U.S., Lumbiganon, P., Prasertcharoensuk, W., and Laopaiboon, M. (2015). Antenatal lower genital tract infection screening and treatment programs for preventing preterm delivery. *The Cochrane database of systematic reviews* 2, CD006178.

Sapolsky, R.M., Romero, L.M., and Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews* 21, 55-89.

Sato, T., Liu, X., Nelson, A., Nakanishi, M., Kanaji, N., Wang, X., Kim, M., Li, Y., Sun, J., Michalski, J., *et al.* (2010). Reduced miR-146a increases prostaglandin E(2) in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182, 1020-1029.

Savory, J.G., Prefontaine, G.G., Lamprecht, C., Liao, M., Walther, R.F., Lefebvre, Y.A., and Hache, R.J. (2001). Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Molecular and cellular biology* 21, 781-793.

Sayed, D., and Abdellatif, M. (2011). MicroRNAs in development and disease. *Physiological reviews* 91, 827-887.

Schaaf, J.M., Mol, B.W., Abu-Hanna, A., and Ravelli, A.C. (2011). Trends in preterm birth: singleton and multiple pregnancies in the Netherlands, 2000-2007. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 118, 1196-1204.

Schena, F., Ciarmoli, E., and Mosca, F. (2011). Patent ductus arteriosus: wait and see? *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 24 Suppl 3, 2-4.

Schiffer, L., Anderko, S., Hannemann, F., Eiden-Plach, A., and Bernhardt, R. (2015). The CYP11B subfamily. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 151, 38-51.

Schwartz, J.T., Becker, S., Sakkas, E., Wujak, L.A., Niess, G., Usemann, J., Reichenberger, F., Herold, S., Vadasz, I., Mayer, K., *et al.* (2014). Glucocorticoids recruit Tgfbr3 and Smad1 to shift transforming growth factor-beta signaling from the Tgfbr1/Smad2/3 axis to the Acvr11/Smad1 axis in lung fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 289, 3262-3275.

**Seaborn, T., Simard, M., Provost, P.R., Piedboeuf, B., and Tremblay, Y. (2010). Sex hormone metabolism in lung development and maturation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21, 729-738.**

Segeer, N., and Soll, R. (2009). Animal derived surfactant extract for treatment of respiratory distress syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD007836.

Seila, A.C., and Sharp, P.A. (2008). Small RNAs tell big stories in Whistler. *Nature cell biology* 10, 630-633.

Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology* 5, R13.

Shafiqat, N., Marschall, H.U., Filling, C., Nordling, E., Wu, X.Q., Bjork, L., Thyberg, J., Martensson, E., Salim, S., Jornvall, H., *et al.* (2003). Expanded substrate screenings of human and Drosophila type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3alpha/7alpha/7beta/17beta/20beta/21-HSD. *The Biochemical journal* 376, 49-60.

Shannon, J.M., and Hyatt, B.A. (2004). Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. *Annual review of physiology* 66, 625-645.

Shannon, J.M., Nielsen, L.D., Gebb, S.A., and Randell, S.H. (1998). Mesenchyme specifies epithelial differentiation in reciprocal recombinants of embryonic lung and trachea. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 212, 482-494.

Shet, M.S., McPhaul, M., Fisher, C.W., Stallings, N.R., and Estabrook, R.W. (1997). Metabolism of the antiandrogenic drug (Flutamide) by human CYP1A2. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 25, 1298-1303.

Shi, R., and Chiang, V.L. (2005). Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques* 39, 519-525.

Shi, X.B., Xue, L., Yang, J., Ma, A.H., Zhao, J., Xu, M., Tepper, C.G., Evans, C.P., Kung, H.J., and deVere White, R.W. (2007). An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 19983-19988.

Shin, J.I., and Brusselle, G.G. (2013). Mechanistic links between COPD and lung cancer: a role of microRNA let-7? *Nature reviews. Cancer* *14*, 70.

Shu, W., Guttentag, S., Wang, Z., Andl, T., Ballard, P., Lu, M.M., Piccolo, S., Birchmeier, W., Whitsett, J.A., Millar, S.E., *et al.* (2005). Wnt/beta-catenin signaling acts upstream of N-myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal-distal patterning in the lung. *Developmental biology* *283*, 226-239.

Silva, D., Venihaki, M., Guo, W.H., and Lopez, M.F. (2006). Igf2 deficiency results in delayed lung development at the end of gestation. *Endocrinology* *147*, 5584-5591.

Simard, J., Ricketts, M.L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F.A., and Melner, M.H. (2005). Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocrine reviews* *26*, 525-582.

**Simard, M., Boucher, E., Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2007). Minimization of PCR efficiency differences between standards and samples through dilution of PCR amplicons in reverse transcription buffer. *Analytical biochemistry* *362*, 142-144.**

**Simard, M., Plante, J., Boucher, M., Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2010). Type 2 and 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and androgen receptor in human fetal lungs. *Molecular and cellular endocrinology* *319*, 79-87.**

**Simard, M., Provost, P.R., and Tremblay, Y. (2006). Sexually dimorphic gene expression that overlaps maturation of type II pneumocytes in fetal mouse lung. *Reprod. Biol. & Endocrinol.* *4*, 25.**

Sippell, W.G., Becker, H., Versmold, H.T., Bidlingmaier, F., and Knorr, D. (1978). Longitudinal studies of plasma aldosterone, corticosterone, deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol, and cortisone determined simultaneously in mother and child at birth and during the early neonatal period. I. Spontaneous delivery. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *46*, 971-985.

Sippell, W.G., Muller-Holve, W., Dorr, H.G., Bidlingmaier, F., and Knorr, D. (1981). Concentrations of aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol, and cortisone determined simultaneously in human amniotic fluid throughout gestation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *52*, 385-392.

Sivik, T., Vikingsson, S., Green, H., and Jansson, A. (2012). Expression patterns of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14 in human tissues. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 44, 949-956.

Smith, B.T. (1979). Lung maturation in the fetal rat: acceleration by injection of fibroblast-pneumonocyte factor. *Science* 204, 1094-1095.

Smith, L.K., Draper, E.S., Manktelow, B.N., Dorling, J.S., and Field, D.J. (2007). Socioeconomic inequalities in very preterm birth rates. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* 92, F11-14.

Sokol, N.S., Xu, P., Jan, Y.N., and Ambros, V. (2008). *Drosophila* let-7 microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. *Genes & development* 22, 1591-1596.

Speek, M., Barry, F., and Miller, W.L. (1996). Alternate promoters and alternate splicing of human tenascin-X, a gene with 5' and 3' ends buried in other genes. *Human molecular genetics* 5, 1749-1758.

Speer, C.P., Sweet, D.G., and Halliday, H.L. (2013). Surfactant therapy: past, present and future. *Early human development* 89 Suppl 1, S22-24.

Speirs, H.J., Seckl, J.R., and Brown, R.W. (2004). Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. *The Journal of endocrinology* 181, 105-116.

Stahn, C., and Buttgereit, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature clinical practice. Rheumatology* 4, 525-533.

Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., and Manna, P.R. (2005). Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Molecular endocrinology* 19, 2647-2659.

Stoll, B.J., Hansen, N.I., Bell, E.F., Shankaran, S., Laptook, A.R., Walsh, M.C., Hale, E.C., Newman, N.S., Schibler, K., Carlo, W.A., *et al.* (2010). Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 126, 443-456.

Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss, J.F., 3rd, Lin, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, K.P., Hart, I.M., Clark, B.J., *et al.* (1995). Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4778-4782.

Sweet, D.G., Carnielli, V., Greisen, G., Hallman, M., Ozek, E., Plavka, R., Saugstad, O.D., Simeoni, U., Speer, C.P., Halliday, H.L., *et al.* (2010). European consensus guidelines on



the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants - 2010 update. *Neonatology* 97, 402-417.

Taeusch, H.W., Ballard, R.A., and Gleason, C.A. (2005). *Avery's diseases of the newborn*, 8th edn (Philadelphia: Elsevier Saunders).

Taichman, D.B., Loomes, K.M., Schachtner, S.K., Guttentag, S., Vu, C., Williams, P., Oakey, R.J., and Baldwin, H.S. (2002). Notch1 and Jagged1 expression by the developing pulmonary vasculature. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 225, 166-175.

Tajima, T., Fujieda, K., Kouda, N., Nakae, J., and Miller, W.L. (2001). Heterozygous mutation in the cholesterol side chain cleavage enzyme (p450scc) gene in a patient with 46,XY sex reversal and adrenal insufficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 3820-3825.

Tan, M.H., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., and Yong, E.L. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica* 36, 3-23.

Tee, M.K., Babalola, G.O., Aza-Blanc, P., Speek, M., Gitelman, S.E., and Miller, W.L. (1995). A promoter within intron 35 of the human C4A gene initiates abundant adrenal-specific transcription of a 1 kb RNA: location of a cryptic CYP21 promoter element? *Human molecular genetics* 4, 2109-2116.

Thompson, J.M., Irgens, L.M., Rasmussen, S., and Daltveit, A.K. (2006). Secular trends in socio-economic status and the implications for preterm birth. *Paediatric and perinatal epidemiology* 20, 182-187.

Thurlbeck, W.M. (1982). Postnatal human lung growth. *Thorax* 37, 564-571.

Tomari, Y., Du, T., Haley, B., Schwarz, D.S., Bennett, R., Cook, H.A., Koppetsch, B.S., Theurkauf, W.E., and Zamore, P.D. (2004). RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* 116, 831-841.

Tomaschitz, A., Pilz, S., Ritz, E., Obermayer-Pietsch, B., and Pieber, T.R. (2010). Aldosterone and arterial hypertension. *Nature reviews. Endocrinology* 6, 83-93.

Torday, J.S. (1984). The sex difference in type II cell surfactant synthesis originates in the fibroblast in vitro. *Exp. lung Res.* 7, 187-194.

Torday, J.S. (1990). Androgens delay human fetal lung maturation in vitro. *Endocrinology* 126, 3240-3244.

Torday, J.S., Nielsen, H.C., Fencl Mde, M., and Avery, M.E. (1981). Sex differences in fetal lung maturation. *The American review of respiratory disease* 123, 205-208.

Torday, J.S., Sun, H., Wang, L., Torres, E., Sunday, M.E., and Rubin, L.P. (2002). Leptin mediates the parathyroid hormone-related protein paracrine stimulation of fetal lung maturation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 282, L405-410.

Trang, P., Medina, P.P., Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Homer, R., Brown, D., Bader, A.G., Weidhaas, J.B., *et al.* (2010). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 29, 1580-1587.

**Tremblay, Y., and Provost, P.R. (2013). Major enzymes controlling the androgenic pressure in the developing lung. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 137, 93-98.**

Tsujishita, Y., and Hurley, J.H. (2000). Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature structural biology* 7, 408-414.

Tucker, J., and McGuire, W. (2004). Epidemiology of preterm birth. *Bmj* 329, 675-678.

van Weerden, W.M., Bierings, H.G., van Steenbrugge, G.J., de Jong, F.H., and Schroder, F.H. (1992). Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life sciences* 50, 857-861.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, RESEARCH0034.

Vandewalle, C., Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F., and Berx, G. (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic acids research* 33, 6566-6578.

Varkonyi-Gasic, E., and Hellens, R.P. (2010). qRT-PCR of Small RNAs. *Methods in molecular biology* 631, 109-122.

Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E.F., and Hellens, R.P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods* 3, 12.

Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.

Venkatesh, V.C., and Katzberg, H.D. (1997). Glucocorticoid regulation of epithelial sodium channel genes in human fetal lung. *The American journal of physiology* 273, L227-233.

Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., *et al.* (2008). Targeted deletion

reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* *132*, 875-886.

Vukelic, S., Stojadinovic, O., Pastar, I., Rabach, M., Krzyzanowska, A., Lebrun, E., Davis, S.C., Resnik, S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2011). Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *The Journal of biological chemistry* *286*, 10265-10275.

Waltering, K.K., Porkka, K.P., Jalava, S.E., Urbanucci, A., Kohonen, P.J., Latonen, L.M., Kallioniemi, O.P., Jenster, G., and Visakorpi, T. (2011). Androgen regulation of micro-RNAs in prostate cancer. *The Prostate* *71*, 604-614.

Wan, H., Kaestner, K.H., Ang, S.L., Ikegami, M., Finkelman, F.D., Stahlman, M.T., Fulkerson, P.C., Rothenberg, M.E., and Whitsett, J.A. (2004). *Foxa2* regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia. *Development* *131*, 953-964.

Wang, Y., Huang, C., Reddy Chintagari, N., Bhaskaran, M., Weng, T., Guo, Y., Xiao, X., and Liu, L. (2013). miR-375 regulates rat alveolar epithelial cell trans-differentiation by inhibiting Wnt/beta-catenin pathway. *Nucleic acids research* *41*, 3833-3844.

Warburton, D., El-Hashash, A., Carraro, G., Tiozzo, C., Sala, F., Rogers, O., De Langhe, S., Kemp, P.J., Riccardi, D., Torday, J., *et al.* (2010). Lung organogenesis. *Current topics in developmental biology* *90*, 73-158.

Weidenfeld, J., Shu, W., Zhang, L., Millar, S.E., and Morrissey, E.E. (2002). The WNT7b promoter is regulated by TTF-1, GATA6, and *Foxa2* in lung epithelium. *The Journal of biological chemistry* *277*, 21061-21070.

Weng, T., Mishra, A., Guo, Y., Wang, Y., Su, L., Huang, C., Zhao, C., Xiao, X., and Liu, L. (2012). Regulation of lung surfactant secretion by microRNA-150. *Biochemical and biophysical research communications* *422*, 586-589.

WHO (November 2015). Preterm birth. Fact sheet N°363. (World Health Organization).

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855-862.

Wijesuriya, S.D., Zhang, G., Dardis, A., and Miller, W.L. (1999). Transcriptional regulatory elements of the human gene for cytochrome P450c21 (steroid 21-hydroxylase) lie within intron 35 of the linked C4B gene. *The Journal of biological chemistry* *274*, 38097-38106.

Willet, K.E., Jobe, A.H., Ikegami, M., Kovar, J., and Sly, P.D. (2001). Lung morphometry after repetitive antenatal glucocorticoid treatment in preterm sheep. *American journal of respiratory and critical care medicine* *163*, 1437-1443.

Williams, A.E., Moschos, S.A., Perry, M.M., Barnes, P.J., and Lindsay, M.A. (2007a). Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 572-580.

Williams, A.E., Perry, M.M., Moschos, S.A., and Lindsay, M.A. (2007b). microRNA expression in the aging mouse lung. *BMC genomics* 8, 172.

Wong L, L.K., Russell I, Chen C Wong L, Lee K, Russell I, Chen C: Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays. Applied Biosystems Application Note 2010: Publication 127AP11-01. Available from: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_044972.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_044972.pdf) [Accessed 2014-04-09].

Wong, L., Spearow, J.L., Castracane, V.D., and Barkley, M. (1995). Genetic variation in plasma androgens and ovarian aromatase activity during mouse pregnancy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 208, 277-282.

Wong, L.L., K.; Russell, I.; Chen, C. (2010). Wong L, Lee K, Russell I, Chen C: Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays. Applied Biosystems Application Note 2010: Publication 127AP11-01. Available from: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_044972.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_044972.pdf) [Accessed 2014-04-09].

Wu, W., Ren, Q., Li, C., Wang, Y., Sang, M., Zhang, Y., and Li, B. (2013). Characterization and comparative profiling of MicroRNAs in a sexual dimorphism insect, *Eupolyphaga sinensis* Walker. *PloS one* 8, e59016.

Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.D., Yartseva, V., Sestan, N., and Steitz, J.A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell* 155, 1568-1580.

Yamagata, K., Fujiyama, S., Ito, S., Ueda, T., Murata, T., Naitou, M., Takeyama, K., Minami, Y., O'Malley, B.W., and Kato, S. (2009). Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Molecular cell* 36, 340-347.

Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., *et al.* (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell* 9, 189-198.

Yang, X., Iwamoto, K., Wang, M., Artwohl, J., Mason, J.I., and Pang, S. (1993). Inherited congenital adrenal hyperplasia in the rabbit is caused by a deletion in the gene encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme. *Endocrinology* 132, 1977-1982.

Young, S.L., Ho, Y.S., and Silbajoris, R.A. (1991). Surfactant apoprotein in adult rat lung compartments is increased by dexamethasone. *The American journal of physiology* *260*, L161-167.

Young, S.L., and Silbajoris, R. (1986). Dexamethasone increases adult rat lung surfactant lipids. *Journal of applied physiology* *60*, 1665-1672.

Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S., and Izaurralde, E. (2009). The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Molecular and cellular biology* *29*, 6220-6231.

Zhang, X., Peng, W., Zhang, S., Wang, C., He, X., Zhang, Z., Zhu, L., Wang, Y., and Feng, Z. (2011). MicroRNA expression profile in hyperoxia-exposed newborn mice during the development of bronchopulmonary dysplasia. *Respiratory care* *56*, 1009-1015.

Zhang, X., Wang, H., Zhang, S., Song, J., Zhang, Y., Wei, X., and Feng, Z. (2012). MiR-134 functions as a regulator of cell proliferation, apoptosis, and migration involving lung septation. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* *48*, 131-136.

Zhang, X.Q., Zhang, P., Yang, Y., Qiu, J., Kan, Q., Liang, H.L., Zhou, X.Y., and Zhou, X.G. (2014). Regulation of pulmonary surfactant synthesis in fetal rat type II alveolar epithelial cells by microRNA-26a. *Pediatric pulmonology* *49*, 863-872.

Zhu, N.L., Li, C., Xiao, J., and Minoo, P. (2004). NKX2.1 regulates transcription of the gene for human bone morphogenetic protein-4 in lung epithelial cells. *Gene* *327*, 25-36.

Zhu, X., Yuan, M., Shakeel, M., Zhang, Y., Wang, S., Wang, X., Zhan, S., Kang, T., and Li, J. (2014). Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *PloS one* *9*, e84730.

Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *Rna* *15*, 781-793.