HAL
open science

Contrôle hormonal de la stéroïdogenèse et tumorigenèse cortico-surrénalienne : utilisation de la trangenèse chez la souris pour le développement de nouvelles lignées cellulaires et de modèles animaux de pathologies tumorales par oncogenèse ciblée

Bruno Ragazzon

To cite this version:

Bruno Ragazzon. Contrôle hormonal de la stéroïdogenèse et tumorigenèse cortico-surrénalienne : utilisation de la trangenèse chez la souris pour le développement de nouvelles lignées cellulaires et de modèles animaux de pathologies tumorales par oncogenèse ciblée. Biologie du développement. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2005. Français. NNT : 2005CLF21629 . tel-00686939

HAL Id: tel-00686939

https://theses.hal.science/tel-00686939v1

Submitted on 11 Apr 2012

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U. 1629

UNIVERSITE D'AUVERGNE
Année 2005

Ecole Doctorale
Des Sciences de la Vie et de la Santé
N° d'ordre 430

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires)

Soutenue le 15 Décembre 2005

BRUNO RAGAZZON

TITRE DE THESE

Contrôle hormonal de la stéroïdogenèse et tumorigenèse cortico-surrénalienne : utilisation de la transgenèse chez la souris pour le développement de nouvelles lignées cellulaires et de modèles animaux de pathologies tumorales par oncogenèse ciblée.

Président :	M. Georges VEYSSIERE
Rapporteurs :	M. Jérôme BERTHERAT
	M. Enzo LALLI
Membres :	M. Michel RAYMONDJEAN
	M. Antoine MARTINEZ
	Mme Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ

Laboratoire de Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire
UMR-CNRS 6547

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Marie et Antoine Martinez. Je vous adresse mes plus sincères remerciements de m'avoir accueilli et pour les nombreux conseils que vous m'avez prodigués durant ces années.

Je remercie le Professeur Georges Veyssière pour son accueil au sein du laboratoire. Merci à tous les membres de l'équipe PCEM pour leur aide, leur soutien et leur amitié ainsi que pour tous les moments subtils et moins subtils. Un grand merci particulier à ma petite Colette pour son aide et son amitié. Merci à Christine, Sandrine, Sophie et Samuel pour vous être occupé à un moment ou à un autre de tous mes babies, merci « les p'tites souris ».

Merci aux Drs J. Bertherat, E. Lalli et M. Raymondjean qui me font l'honneur de juger ce travail.

RESUME

L'utilisation de transgènes actifs dans le cortex surrénalien de souris (régions régulatrices de *akr1b7* et *CYP11A1*) a été choisie d'une part, pour dériver des lignées cellulaires différenciées (lignées ATC) jusque là non disponibles par oncogenèse ciblée de l'AgT de SV40 et d'autre part, pour tester le pouvoir transformant de gènes candidats chez l'homme au développement de tumeurs cortico-surrénaliennes malignes (cortico-surrénalomes ou ACC) et bénignes (hyperplasies micronodulaires pigmentées des surrénales ou PPNAD). Le caractère malin des ACC a été associé à une sur-expression du facteur de croissance IGF2 et à une perte d'expression de l'inhibiteur de cycle cellulaire $p57^{KIP2}$. Le développement de PPNAD, tumeurs endocrines hypersécrétantes du cortex surrénalien est, quant à lui, associé à des mutations du gène *PRKAR1A*, codant la sous-unité régulatrice RIa de la PKA. Dans ces deux pathologies cortico-surrénaliennes le lien de causalité entre ces anomalies génétiques et l'initiation du phénotype tumoral (ACC et PPNAD) ou l'hyperactivité endocrine (PPNAD) n'a jamais été démontré *in vivo*.

Les lignées ATC (Adrenocortical Tumor Cells) exprimant l'AgT sous le contrôle du promoteur *akr1b7* présentent un haut degré de différenciation et constituent à ce jour le meilleur modèle disponible de cellules de zone fasciculée du cortex surrénalien. En effet, elles produisent le stéroïde majeur cette zone (corticostérone) sous le contrôle de doses physiologiques d'ACTH. Elles expriment l'ensemble des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse et ont permis d'explorer les rôles antagonistes des facteurs de transcription SF-1 et DAX-1 dans le mécanisme d'action de l'ACTH. Elles ont également permis de mettre en évidence que la prolactine stimulait la stéroïdogenèse en exerçant un contrôle transcriptionnel sur les même gènes cibles que l'ACTH. Des clones stables de cellules ATC sur-exprimant IGF2 ou ayant perdu en partie l'expression de $p57^{KIP2}$ (antisens) n'acquièrent pas de phénotype malin et aucune anomalie n'a été observée chez les animaux transgéniques sur-exprimant IGF2 dans le cortex-surrénalien sous le contrôle des promoteurs *akr1b7* et *CYP11A1*. Ces données suggèrent que la sur-expression d'IGF2 et que la perte d'expression de $p57^{KIP2}$ ne sont pas impliquées, de manière individuelle, dans l'induction du phénotype cancéreux des cellules cortico-surrénaliennes. L'expression dans le cortex surrénalien chez la souris d'une forme tronquée de RIa (RIa? 184-236) retrouvée chez des patients atteints de PPNAD, est corrélée à une augmentation de la sensibilité à l'ACTH de gènes clés de la stéroïdogenèse (StAR, SR-BI AKR1B7), à une augmentation d'expression de RIIß ainsi qu'à une hypercorticostéronémie. Ces résultats montrent pour la première fois *in vivo* que cette mutation perturbe la voie PKA et peut être responsable de l'hyperactivité endocrine rencontrée dans cette pathologie.

ABREVIATIONS

3βHSD ou 3βHSD II : 3β-HydroxyStéroïde Déshydrogénase
AC : Adénylate Cyclase ou Adénylyl-Cyclase
ACC : AdrenoCortical Carcinoma
ACTH : Adreno Cortico Trophic Hormone
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AF : Activation Function
AgT : Antigène T
AHC : hypoplasie surrénalienne congénitale humaine
AIMAH : ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia
AKAPs : A-Kinase Anchoring Proteins
AKR1B1 : Aldo Keto Reductase 1B1
AKR1B7 ou MVDP : Aldo Keto Reductase 1B7 ou Mouse Vas Deferens Protein
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANGII : Angiotensine II
APC : Adenomatous Polyposis Coli
AR : Androgen Receptor
ARNm : Acide RiboNucléique messager
AT1R et AT2R : Angiotensin Receptor 1 et 2
ATC : Adrenocortical Tumor Cells
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine TriPhosphate
AVP : Arginine VasoPressine
C/EBP : CAAT/Enhancer Binding Protein
CAT : Chloramphénicol Acétyl Transférase
CBP : CREB-Binding Protein
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CDKIs : Cyclin Dependent Kinase Inhibitors
CHO : Chinese Hamster Ovary
CLA-1 : CD36 and LIMPII Analogous-1
CLIP : Corticotrophin Like Intermediate lobe Peptide
CMV : CytoMégaloVirus
CNC : syndrome ou complexe de Carney
CRE : cAMP Response Element
Cre : Causes recombination
CREB : CRE-Binding protein
CRH : Corticotropin Releasing Hormone
CRS : cAMP-Responsive Sequence ou séquence de réponse à l'AMPc
CRU : cAMP-Responsive Unit
CTCF : CCCTC binding Factor
CYP11A1 ou P450scc : CYtochrome P450 cholesterol Side Chain Clivage
CYP11B1 ou P450c11β : CYtochrome P450 11β-hydroxylase
CYP11B2 ou P450c11AS : CYtochrome P450 aldostérone synthase
CYP17 ou P450c17 : CYtochrome P450 17 a-hydroxylase/ 17, 20 lyase
CYP19 ou P450arom : CYtochrome P450 aromatase
CYP21A2 ou P450c21 : CYtochrome P450 21-hydroxylase
Ca, ß et ? : sous-unités catalytiques a, ß et ? de la PKA
DAX-1 : Dosage sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene 1
DBD : DNA Binding Domain
DBI : Diazepam-Binding Inhibitor

DHEA : DeHydroEpiAndrosterone
DHEAS : DeHydroEpiAndrosterone Sulphate
DMR : Differentially Methylated Region
dpc : days post coïtum
dpo : days post ovulation
dpp : days post partum
DSH : DiSHeveled
DSS : Dosage Sensitive Sex reversal
E : Embryonic day
Egr-1 : Early growth response protein 1
ELP : Embryonic Long terminal repeat-binding Protein
EMS : Ethyl-Methyl-Sulfonate
ER : Estrogen Receptor
ERK : Extra-cellular-signal-Regulated Kinase
FGD : Familial Glucocorticoid Deficiency ou syndrome héréditaire de résistance à l'ACTH
FISH : Fluorescent In Situ Hybridation
FSH : Follicle Stimulating Hormone
Ftz-F1 : Fushi tarazu Factor 1
GATA-4 : GATA-binding factor 4
GDP : Guanosine DiPhosphate
GNAS1 : gène de la protéine Gas
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
GR : Glucocorticoid Receptor
GSK3ß : sérine-thréonine Glycogène Synthase Kinase 3 ß
GTP : Guanosine TriPhosphate
GTPase : enzyme de transfert de la liaison riche du GTP
hCG : human Chorionic Gonadotropin
HDL : High Density Lipoprotein
HMG-CoA : 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-Coenzyme A
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
hTERT : human TElomerase Reverse Transcriptase
IBMX : 3-Isobutyl-1-MethylXanthine
ICR : Imprinting Control Region
IGF : Insulin-like Growth Factor
IGF1R ou IGF2R : IGF type 1 receptor ou IGF type 2 receptor
IGFBP2 : IGF Binding Protein-2
JAK2 : Janus Kinase 2
kb : kilobases
KCNQ1 : potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1
kDa : kiloDalton
KO : Knock-Out
LBD : Ligand Binding Domain
LCCSCT : Large-Cell Calcifying Sertoli Cell Tumors
LDL : Low Density Lipoprotein
LH : Luteinizing Hormone
LIT1 ou KCNQ10T1 ou KvLQT1-AS : KCNQ1-overlapping transcript 1
LOH : pertes d'hétérozygotie
LoxP : Locus of X-ing-over P
LPH : LiPotrophic Hormone
MAP-Kinase : Mitogen-Activated Protein kinase

MC2R : MelanoCortin 2 Receptor
MIS : Mullerian Inhibiting Substance
MRAP : MC2R Accessory Protein
MSH : Melano-Stimulating Hormone
NAD(H) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (réduit)
NADP(H) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (réduit)
NCoR : Nuclear receptor CoRepressor
NEM 1 : Néoplasies Endocriniennes Multiple de type 1 ou syndrome de Wermer
nGRE : negative Glucocorticoid Response Element
NLS : signal de localisation nucléaire
NO : Nitric Oxide
$p57^{kip2}$ ou CDKN1C : Cyclin Dependent Kinase inhibitor 1c
PAF : Polypose Adénomateuse Familiale ou syndrome de Gardner
PAP7 : Peripherial benzodiazepine receptor Associated Protein
pb : paire de bases
PBR : Peripheral Benzodiazepine Receptor
PEPCK : PhosphoEnol-Pyruvate Carboxy-Kinase
PKA : Protéine Kinase A ou Protéine Kinase AMPc-dépendante
PKC : Protéine Kinase C
POMC : Pro-OpioMélanoCortine hypophysaire
PPNAD : Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease
PR : Progesterone Receptor
PRKAR1A : sous-unité régulatrice RI alpha de la PKA
PRL : Prolactine
Rb : Rétinoblastome
RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G ou récepteurs à sept domaines transmembranaires
RGS : Regulators of G-protein Signalling
RI et RII a, ß : sous-unités régulatrices I et II a, ß de la PKA
RIP140 : Receptor Interacting Protein 140
R-LDL : Récepteur membranaires des LDL
RLF : Relaxin-Like Factor
R-LH : Récepteur à LH
R-PRL : Récepteur à la prolactine
RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SBW : Syndrome de Beckwith-Wiedemann
SCP-2 : Sterol Carrier Protein 2
SF-1 ou Ad4BP: Steroidogenic Factor-1 ou Adrenal 4-Binding Protein
SFRE : SF-1 Responsive Element
SHP : Small Heterodimeric Partner
Sp1 : Selective promoter factor 1
SR-BI : Scavenger Receptor class B type I
SRY : Sex determining Region on the Y chromosome
StAR : Steroidogenic Acute Regulatory protein
SV40 : Simian Virus 40
TCF/LEF : T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor
TP53 : Tumor Protein p53
TSP1 : ThromboSPondine 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VMH : Ventral Medial Hypothalamus

Wnt : Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family
WT-1 : Wilm's Tumor- associated gene 1
ßTrCP : ß Transducin Repeat Containing Protein

TABLE DES MATIERES

BIBLIOGRAPHIE 1

I. La cortico-surrénale 2

I.A. Généralités 2

I.B. La stéroidogenèse surrénalienne 3
I.B.1. Transport du cholestérol 3
I.B.2. Synthèse des stéroïdes 5
I.B.3. Détoxication des produits secondaires de la stéroïdogenèse 6

I.C. Le mode d'action de l'ACTH 6
I.C.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien 6
I.C.2. Effets aigus et chroniques de l'ACTH 7
I.C.3. Récepteur à l'ACTH et voie de l'AMPc/PKA 8
I.C.3.a. MC2R (melanocortin 2 receptor) 8
I.C.3.b. Les protéines G 9
I.C.3.c. Les adénylates cyclases (ou adénylyl-cyclases) 12
I.C.3.d. La PKA et les relais transactivateurs de l'AMPc 13

I.D. Les récepteurs nucléaires, SF1 et DAX1, impliqués dans le développement et la fonction de la surrénale. 16
I.D.1. Caractéristiques de SF-1 et de DAX-1 16
I.D.2. Sites d'expression de SF-1 et de DAX-1 (tableau 2) 18
I.D.2.a. *sf-1/SF-1* 18
I.D.2.b. *dax-1/DAX-1* 20
I.D.3. DAX-1 et SF-1, acteurs aux fonctions opposées 21
I.D.3.a. SF-1, un activateur de la stéroïdogenèse. 21
I.D.3.b. DAX-1, un répresseur de la stéroïdogenèse 23
I.D.3.c. Le ratio SF-1/DAX-1 24
I.D.3.d. DAX-1 et SF-1 impliqués dans la prolifération cellulaire et les tumeurs. 25
I.D.4. Invalidation de *sf-1 versus* pathologies humaines (tableau 3) 27
I.D.5. Invalidation de *dax-1 versus* pathologies humaines (tableau 3) 28

II. Les lignées surrénaliennes 29

II.A. Tentatives d'immortalisation des cultures primaires 30
II.A.1. Les cellules cortico-surrénaliennes de rongeurs 30
II.A.2. Les cellules cortico-surrénaliennes bovines 31
II.A.3. Les cellules cortico-surrénaliennes humaines 31

II.B. Les lignées dérivées de tumeurs spontanées 32
II.B.1. Les cellules H295 32
II.B.1.a. Réponse hormonale et expression des récepteurs aux hormones 33
II.B.1.b. Synthèse des stéroïdes 34
II.B.1.c. Expression des enzymes de la stéroïdogenèse surrénalienne. 35
II.B.2. Les cellules surrénaliennes de souris Y1 35
II.B.2.a. Origine des cellules Y1 35
II.B.2.b. Stéroïdes synthétisés par les cellules Y1 36
II.B.2.c. Sous-clones de la lignée Y1 37

II.C. Les lignées surrénaliennes obtenues à l'aide de l'oncogenèse ciblée. 38
II.C.1. Utilisation des séquences 5' régulatrices du gène de l'inhibine α. 39
II.C.2. Utilisation des séquences 5' régulatrices du gène *CYP11A1*. 41
II.C.3. Utilisation d'un AgT thermosensible 42

III. Les tumeurs de la cortico-surrénale 43

III.A. Les différentes lésions cortico-surrénaliennes 44
III.A.1. Les lésions bénignes de la cortico-surrénale 44
III.A.1.a. L'adénome cortico-surrénalien 44
III.A.1.b. Les hyperplasies cortico-surrénaliennes 44
III.A.2. Les lésions malignes de la cortico-surrénale. 45

III.B. Les syndromes dus aux hypersécrétions en cas d'atteintes cortico-surrénaliennes. 45
III.B.1. Le syndrome de Cushing 46
III.B.2. Le syndrome de Conn 46
III.B.3. Le syndrome adréno-génital 46

III.C. Les formes familiales des tumeurs cortico-surrénaliennes. 47
III.C.1. Le syndrome de Wermer (OMIM 131100) 47
III.C.2. Le syndrome de Li-Fraumeni (OMIM 151623) 48
III.C.3. Le syndrome de Gardner (OMIM 175100) 48
III.C.4. Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (OMIM 130650) 49
III.C.5. Le syndrome de Carney (OMIM 160980) 51

III.D. Les problèmes de diagnostic liés aux tumeurs cortico-surrénaliennes. 52

III.E. Les cortico-surrénalomes et les PPNAD. 54
III.E.1. Les cortico-surrénalomes : p57^{kip2} et le système IGF. 54
III.E.2. Les PPNAD : implication du gène *PRKAR1A* 57

IV. Projets 59

RESULTATS ET DISCUSSION 63

PREMIERE PARTIE : Caractérisation biochimique et moléculaire des cellules ATC . 64

I. Introduction 64

II. Résultats 66

II.A. ARTICLE 1 67

II.B. ARTICLE 2 68

III. Discussion 69

DEUXIEME PARTIE : Projet IGF2, p57^{KIP2} et cortico-surrénalomes 73

I. Introduction 73

II. Résultats 74

II.A. Exploration fonctionnelle dans la lignée cellulaire cortico-surrénalienne ATC1. 74
II.A.1. Validation des constructions en transfection transitoire. 75
II.A.2. Sélection des clones stables 75
II.A.3. Analyses. 76
II.A.3.a. Potentiel de prolifération des différents clones 76
II.A.3.b. « Interaction » IGF2/p57^{KIP2} et cycle cellulaire 76

II.B. Exploration fonctionnelle dans les souris transgéniques. 77
II.B.1. Validation des constructions avant la trangenèse 77
II.B.2. Souris transgéniques 77
II.B.3. Analyses histologiques 78

III. Discussion 78

TROISIEME PARTIE : Projet RIa et PPNAD 81

I. Introduction 81

II. Résultats 82

II.A. Constructions et souris transgéniques 82

II.B. Modèle de souris testant l'effet du mutant RIa? 184-236 83
II.B.1. Caractérisations moléculaire et hormonale de la lignée *akr1b7*-RIa-? #24 83
II.B.2. Impact sur l'activité PKA 85

II.B.3. Analyses histologiques 86
III. Discussion ***86***
MATERIELS ET METHODES **91**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **95**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **106**

ANNEXE **134**

BIBLIOGRAPHIE

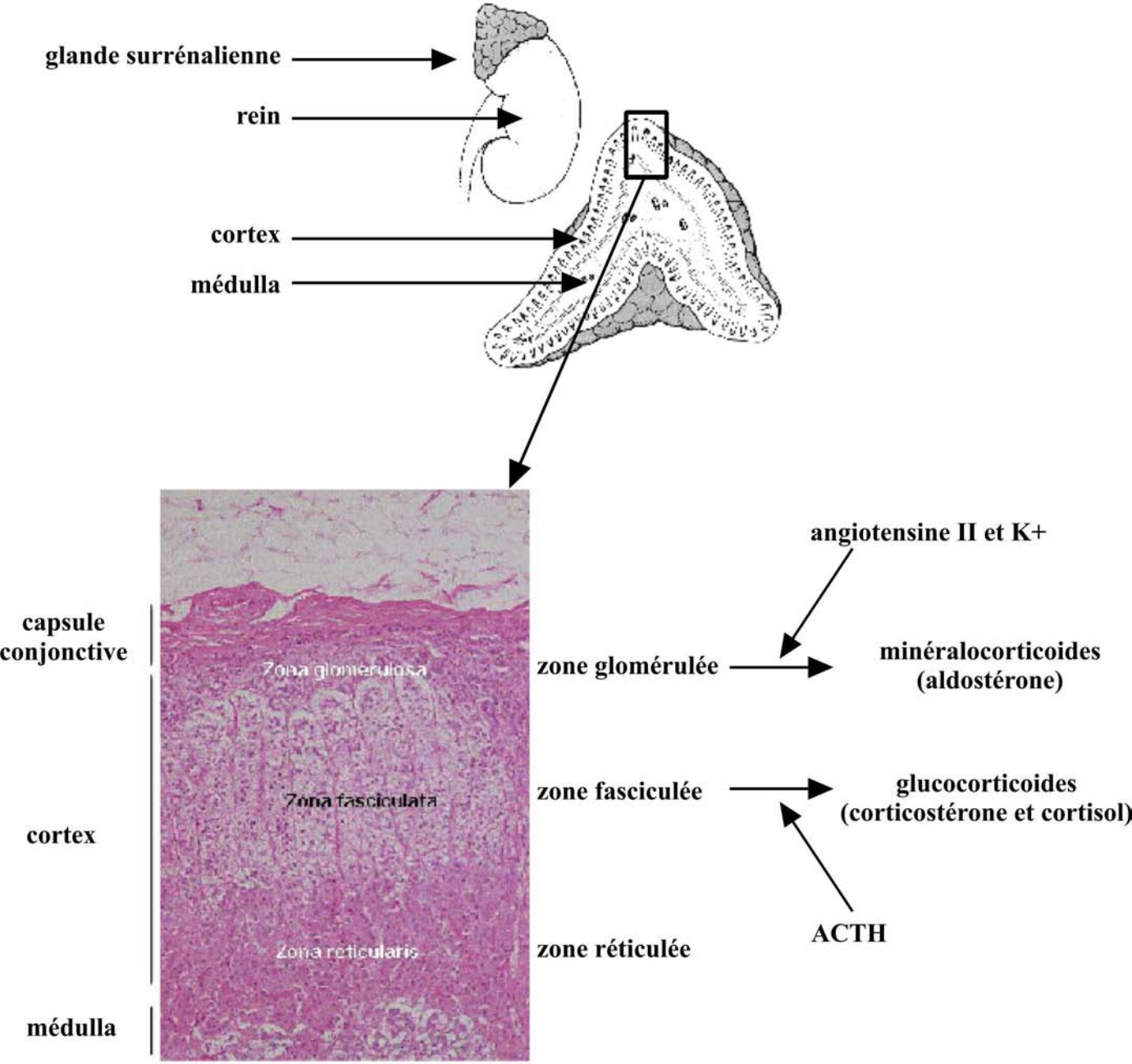


Figure 1: Représentation schématique et coupe transversale de surrénale

I. La cortico-surrénale

I.A. Généralités

Les surrénales sont des glandes endocrines encapsulées, surplombant les reins (Figure 1). Elles sont formées par deux tissus d'origine embryonnaire et de fonctions différentes (Orth and Kovacs, 1998).

- **La médullo-surrénale** ou medulla, d'origine neuro-ectodermique, constitue le centre de la surrénale. Lors de la formation de l'ébauche primitive du système sympathique, des sympathogonies (éléments cellulaires) migrent jusqu'à l'ébauche de la cortico-surrénale pour constituer la médullo-surrénale. Ces cellules, nommées cellules chromaffines, produisent les catécholamines (l'adrénaline et la noradrénaline).
- **La cortico-surrénale**, d'origine mésodermique, entoure la médulla chez les mammifères. Elle se différencie à partir de l'épithélium coelomique dorsal qui est également à l'origine des gonades et des reins. Elle est subdivisée en trois zones concentriques chez les mammifères suivant des critères morphologiques et fonctionnels (Keegan and Hammer, 2002; Orth and Kovacs, 1998; Rainey, 1999) (Figure 1).
    - La zone glomérulée, située directement sous la capsule conjonctive, produit les minéralocorticoïdes tels que l'aldostérone sous le contrôle du système rénine-angiotensine et des concentrations sériques en ions potassium (K+). L'aldostérone contrôle l'homéostasie hydro-minérale.
    - La zone fasciculée, qui représente l'essentiel du cortex (75-80%), est constituée de cellules stéroïdogènes disposées longitudinalement, en colonnes dans l'axe medulla-cortex. Ces cellules produisent, sous le contrôle de l'hormone hypophysaire corticotrope (l'ACTH), les glucocorticoïdes (le cortisol chez l'homme et le bœuf et la corticostérone chez les rongeurs). Ces glucocorticoïdes jouent un rôle dans le développement embryonnaire, dans la réponse inflammatoire et dans le métabolisme énergétique.
    - La zone réticulée, la plus interne du cortex, produit de faibles quantités de glucocorticoïdes et, à l'exception des rongeurs, elle est la source de déhydroépiandrostérone (DHEA) et de son dérivé sulfate (DHEAS).

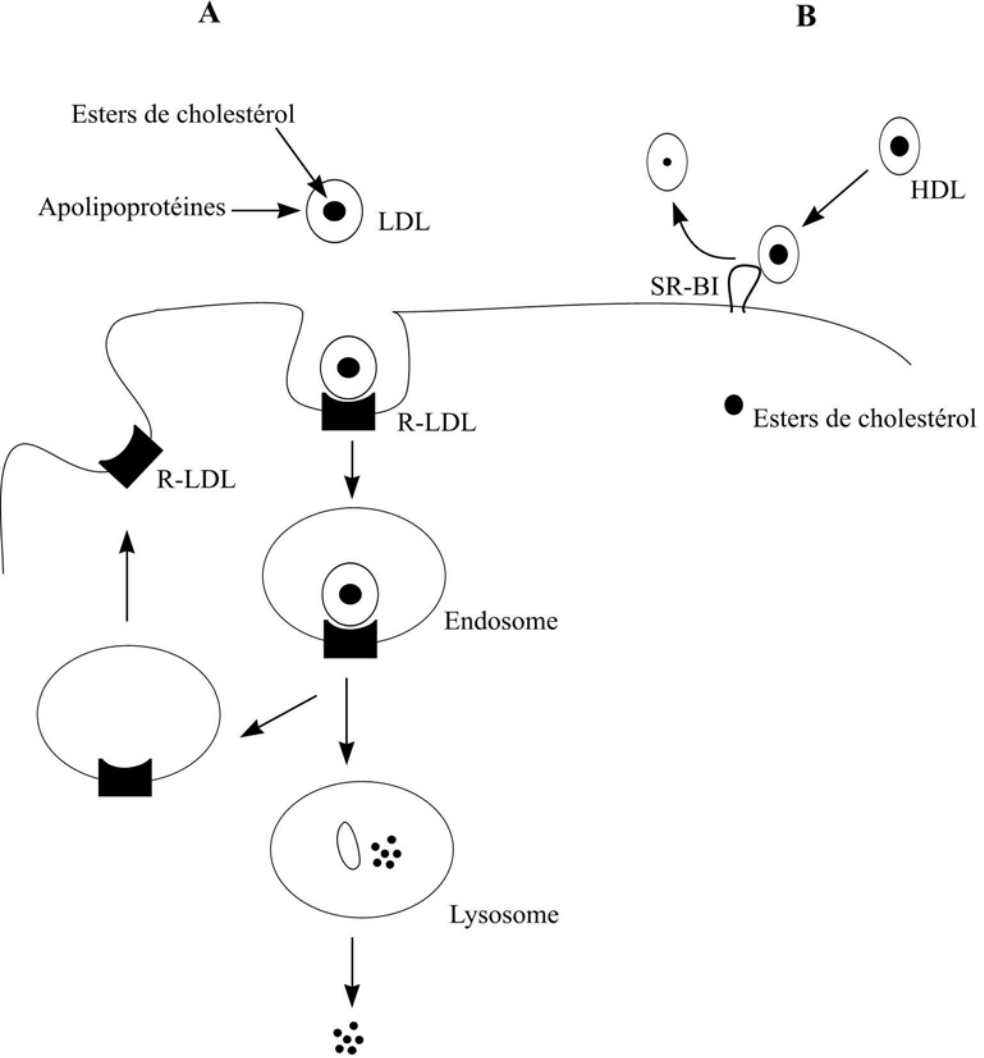


Figure 2: Récepteurs aux LDL et aux HDL

A, La particule LDL formée d'apolipoprotéines et de cholestérol estérifié est captée par son récepteur (R-LDL) et rentre dans la cellule pas endocytose. Le cholestérol estérifié est libéré par le lysosome. Le récepteur LDL est ensuite recyclé.

B, Mode d'action de SR-BI. Les particules HDL chargées en cholestérol se lient au récepteur SR-BI qui permet l'entrée sélective du cholestérol sans internalisation de la fraction apolipoprotéique du HDL. Le HDL appauvri en cholestérol est alors relargué.

I.B. La stéroidogenèse surrénalienne

De nombreuses hormones stéroïdiennes sont synthétisées par les gonades, le cortex surrénalien, le système nerveux central (neuro-stéroïdes, dans le cas du cerveau) et le placenta. Ces hormones stéroïdiennes, présentant une grande diversité d'effets biologiques, ont comme précurseur commun le cholestérol. La nature des hormones produites dépend des enzymes de la stéroïdogenèse exprimées dans le tissu concerné. Ces synthèses correspondent à une suite d'oxydations catalysées par des enzymes spécifiques. L'essentiel des informations présentées dans ce chapitre concernera le cortex surrénalien.

I.B.1. Transport du cholestérol

Le cholestérol utilisé par les cellules du cortex surrénalien, pour produire les différentes hormones stéroïdiennes, a une origine principalement exogène, et est fourni par le foie ou issu de l'alimentation. Il est transporté dans le plasma par des lipoprotéines (Gwynne and Hess, 1980; Gwynne *et al.*, 1984; Kovanen *et al.*, 1980; Verschoor-Klootwyk *et al.*, 1982; Williams *et al.*, 2000) HDL (High Density Lipoprotein) et LDL (Low Density Lipoprotein) qui délivrent le cholestérol au niveau des cellules avec une contribution différente selon les espèces. Les rongeurs utilisent les HDL comme source majeure de cholestérol pour la stéroïdogenèse (Andersen and Dietschy, 1981; Gwynne and Hess, 1980) alors que l'homme utilise les LDL (Higashijima *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 1999). Les HDL et les LDL sont captées au niveau de la membrane plasmique des cellules par différents récepteurs. L'entrée des LDL implique majoritairement le récepteur membranaire des LDL (R-LDL) (Figure 2-A), qui est internalisé par endocytose une fois le complexe LDL/R-LDL formé (Brown and Goldstein, 1986; Krieger and Herz, 1994). Le cholestérol estérifié des LDL est alors hydrolysé dans les lysosomes, libéré dans la cellule puis le récepteur LDL est recyclé (Brown and Goldstein, 1986; Paavola *et al.*, 1985). L'autre récepteur impliqué dans l'entrée du cholestérol dans les cellules, est le récepteur SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) (Figure 2-B). SR-BI a tout d'abord été identifié chez les rongeurs (Acton *et al.*, 1994), comme un nouveau membre de la famille des récepteurs « éboueurs » (scavenger) de la classe B. Son homologue humain, CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1), a été cloné puis caractérisé (Calvo and Vega, 1993; Murao *et al.*, 1997). Il s'est ensuite distingué par sa capacité à lier les HDL avec une forte affinité, faisant de SR-BI un bon candidat au rôle de récepteur des HDL. Cette fonction a été mise en évidence dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), dans lesquelles la surexpression de SR-BI par transfection entraîne une augmentation de la liaison spécifique des HDL et une stimulation de l'entrée sélective du cholestérol estérifié des HDL

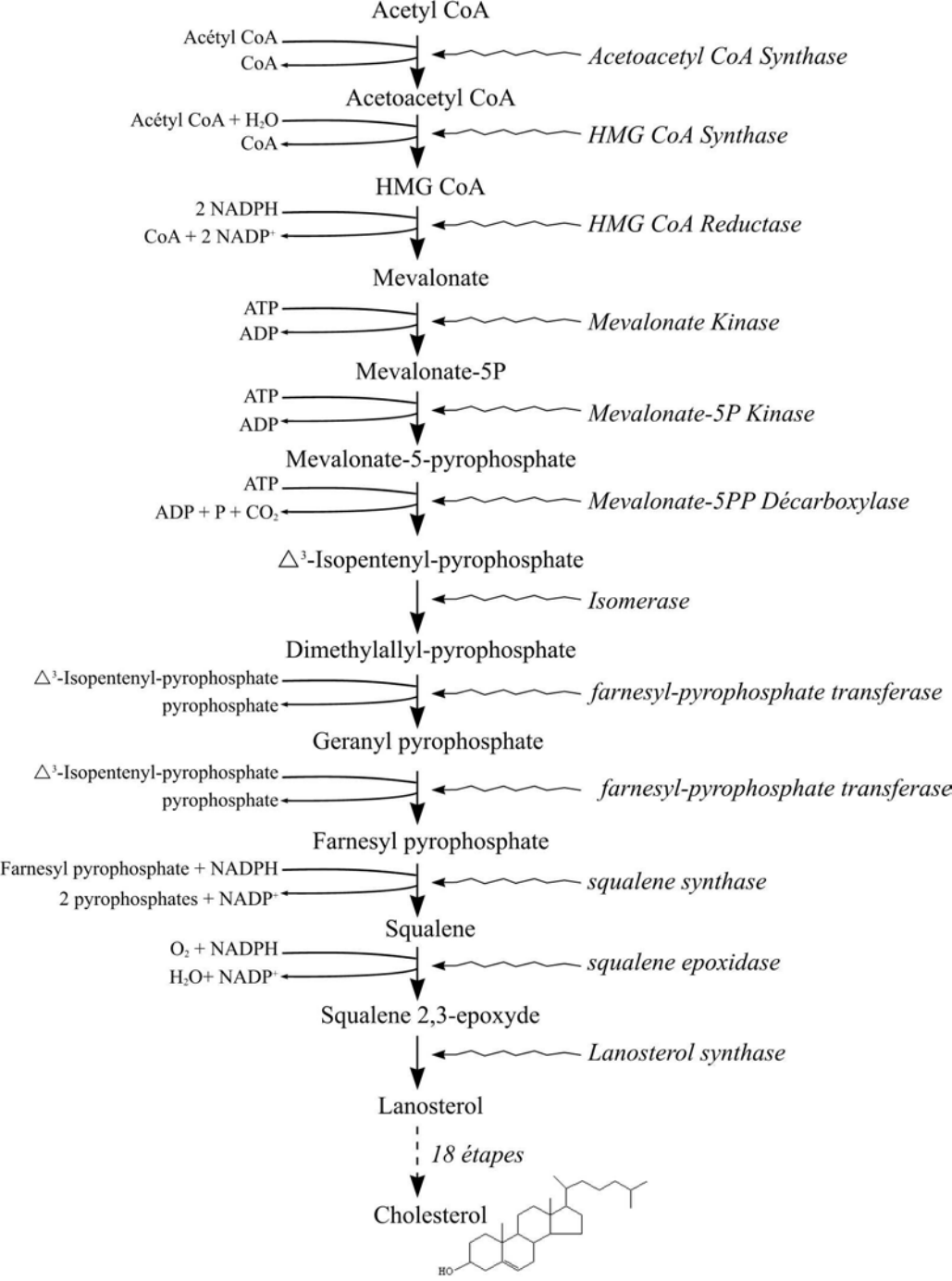


Figure 3: Synthèse de cholestérol *de novo*

dans les cellules, sans internalisation de la particule entière à la différence de R-LDL (Acton *et al.*, 1996). SR-BI est également capable de prendre en charge le cholestérol estérifié des LDL dans les tissus stéroidogènes (Swarnakar *et al.*, 1999). Dans la surrénale, l'expression de SR-BI est contrôlée par l'angiotensine II (ANGII) et par l'ACTH (Cherradi *et al.*, 2001; Rigotti *et al.*, 1996) et celle de R-LDL par l'ACTH (Lehoux and Lefebvre, 1991).

Grâce à l'activité de l'HMG-CoA synthase et de l'HMG-CoA réductase, il existe dans la surrénale une synthèse *de novo* de cholestérol (Figure 3) qui ne représente chez l'homme qu'au maximum 20% de la quantité nécessaire à la stéroïdogenèse surrénalienne. Cette synthèse *de novo* permet de répondre à une demande accrue en stéroïdes (Toth *et al.*, 1990).

Dans les cellules surrénaliennes, les gouttelettes lipidiques contenant le cholestérol sont transportées et ciblées par la protéine SCP-2 (Sterol Carrier Protein 2) vers la mitochondrie (Chanderbhan *et al.*, 1982), dans laquelle vont se dérouler les premières étapes de la stéroïdogenèse (Figure 4). La protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) et le récepteur PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor) sont impliqués dans le transport du cholestérol jusqu'à la membrane mitochondriale interne.

StAR est associé à la membrane mitochondriale externe et permet de transférer le cholestérol vers l'espace intermembranaire (Bose *et al.*, 2002a; Bose *et al.*, 2002b; Stocco, 2001). Là, le cholestérol va ensuite devoir passer la membrane mitochondriale interne pour être pris en charge par la protéine CYP11A1 (P450scc) impliquée dans la première étape de la stéroïdogenèse. Dans les tissus stéroïdogènes, l'activité de la protéine StAR est rapidement stimulée par les hormones trophiques via la phosphorylation par la PKA (Protéine Kinase A ou protéine kinase AMPc-dépendante) d'un résidu sérine conservé chez l'homme et la souris (Arakane *et al.*, 1997). Cela donne à StAR un rôle essentiel dans la phase de réponse aiguë de la stéroïdogenèse.

PBR est le deuxième acteur impliqué dans le transport du cholestérol à travers les membranes mitochondriales. Il est exprimé fortement dans les cellules stéroïdogènes et son ligand endogène, DBI (Diazepam-Binding Inhibitor), stimule son activité et induit la translocation du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne (Krueger and Papadopoulos, 1990). Les mécanismes de régulation de PBR et de son ligand DBI dans les tissus stéroïdogènes ne sont pas clairement élucidés. En effet, chez des rats hypophysectomisés, conduisant à une diminution des niveaux d'ACTH plasmatiques, on observe une réduction de l'accumulation des ARNm *DBI* et *PBR*, respectivement de 20 et 50%. Ces niveaux redeviennent normaux après un traitement substitutif par de l'ACTH

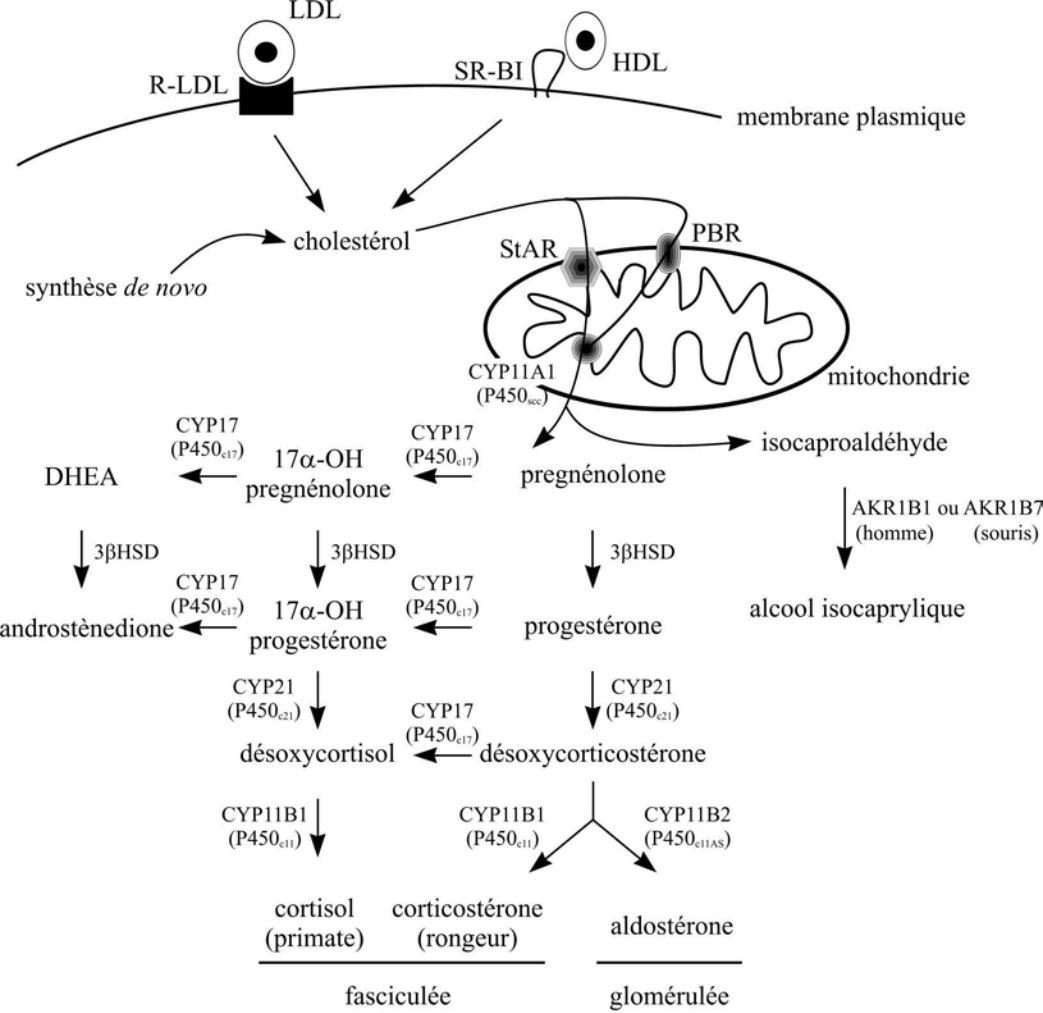


Figure 4: Voies de synthèse des stéroïdes de la cortico-surrénale chez les rongeurs.
Tous les acteurs sont présents dans l'ensemble du cortex sauf :

- CYP11B2 ($P450_{c11AS}$) spécifique de la zone glomérulée.
- CYP11B1 ($P450_{C11}$) et AKR1B7 spécifiques de la zone fasciculée.

(Cavallaro *et al.*, 1993). Cependant, d'autres études montrent qu'*in vivo* et *in vitro*, la synthèse de DBI et de PBR est insensible aux hormones trophiques, dont l'ACTH (Amri *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1992), et que c'est essentiellement la liaison du ligand DBI à PBR qui module le transport du cholestérol. De plus, PBR interagirait avec PAP7 (PBR Associated Protein 7), une protéine associée à la sous-unité régulatrice RIa de la PKA (la PKA est décrites § I.C.3.d.) et capable de stimuler la stéroïdogenèse (Liu *et al.*, 2003). Cette association permettrait le rapprochement de la PKA et de PBR, entraînant sa phosphorylation (Whalin *et al.*, 1994) et celle de la protéine StAR, avec qui PBR semble interagir physiquement et fonctionnellement pour permettre le transfert du cholestérol (Hauet *et al.*, 2002; West *et al.*, 2001).

I.B.2. Synthèse des stéroïdes

La transformation du cholestérol en stéroïde nécessite une série d'hydroxylations catalysées par des monooxygénases particulières, les cytochromes P450 ou CYPs, et deux hydroxystéroïdes déshydrogénases. Les cytochromes P450 de la stéroïdogenèse transfèrent les électrons du NADH vers les stéroïdes, en utilisant des protéines intermédiaires de transport et la voie de l'oxygène. Les gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogenèse présentent des profils d'expression tissulaire différents, conduisant à une synthèse d'hormones spécifiques à chaque tissu et même à chaque zone du cortex surrénalien (Figure 4).

La première étape de transformation du cholestérol se déroule au niveau de la membrane mitochondriale interne. CYP11A1 (P450scc), présente dans les mitochondries de tous les tissus stéroïdogènes, va cliver le cholestérol en pregnénolone et en isocaproaldéhyde. Ces produits vont ensuite ressortir de la mitochondrie et la pregnénolone est transformée en progestérone dans le réticulum endoplasmique sous l'action d'une 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3βHSD ou 3βHSD II), exprimée dans la surrénale, les gonades et le placenta de certaines espèces.

L'hydroxylation de la progestérone, effectuée par le cytochrome P450 21-hydroxylase (P450c21 ou CYP21A2), permet de former de la désoxycorticostérone. Cette transformation du cholestérol en désoxycorticostérone est commune à tout le cortex surrénalien chez la souris. Puis, au niveau de la zone glomérulée, le cytochrome P450 aldostérone synthase (P450c11AS ou CYP11B2) produit l'aldostérone, alors que dans la zone fasciculée, c'est la cytochrome P450 11β hydroxylase (P450c11β ou CYP11B1) qui va intervenir pour former le cortisol, ou chez les rongeurs, la corticostérone. Cette différence est due à l'absence

```
  1 MPRSCCSRSG ALLLALLLQA SMEVRGWCLE SSQCQDLTTE SNLLECIRAC  50
 51 KPDLSAETPM FPGNGDEQPL TENPRKYVMG HFRWDRFGRR NSSSSGSSGA 100
101 GQKREDVSAG EDCGPLPEGG PEPRSDGAKP GPREGKRSYS MEHFRWGKPV 150
151 GKKRRPVKVY PNGAEDESAE AFPLEFKREL TGQRLREGDG PDGPADDGAG 200
201 AQADLEHSLL VAAEKKDEGP YRMEHFRWGS PPKDKRYGGF MTSEKSQTPL 250
251 VTLFKNAIIK NAYKKGE                                    267
```

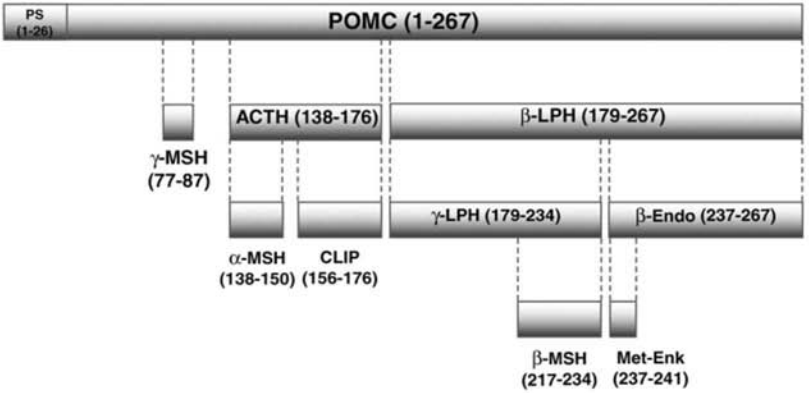


Figure 5: Représentation schématique de la maturation de la POMC.
Les chiffres entre parenthèses correspondent à la portion de la séquence concernée de la POMC. Il est à noter que la β-Endorphine (30 aa), après perte des 16 acides aminés C-terminaux, peut conduire à la γ-Endorphine (15 aa) qui, elle-même, peut conduire à l' α-Endorphine (14 aa) après perte d'un acide aminé au niveau C-terminal (non représenté sur le schéma).

Détail des peptides représentés :

Adrénocorticotropine (ACTH) (39 aa, correspondant aux acides aminés 138-176 de la POMC)
- mélanotropine (α-MSH) (13 aa, correspondant à l'ACTH 1-13)
- Corticotrophin Like Intermediate Lobe Peptide - CLIP (22 aa, correspondants à l'ACTH 18-39)

β-lipotropine (β-LPH) (91 aa, correspondant aux acides aminés 179-267 de la POMC)
- γ-LPH (56 aa, correspondant à la β-LPH 1-56)
- β-Endorphine (31 aa, correspondant à la β-LPH 61-91)
- β-MSH (22 aa, correspondant à la β-LPH 41-58)
- Met-Enképhaline (5 aa, correspondant à la β-LPH 1-5)

γ-MSH (11 aa, correspondant aux acides aminés 77-87 de la POMC)

d'expression chez les rongeurs de la P450c17 (ou CYP17). Cette protéine possède deux activités enzymatiques qui permettent de favoriser la synthèse de glucocorticoïdes ou d'androgènes selon l'activité mise en jeu (Figure 4). Les principaux précurseurs androgéniques surrénaliens produits sont la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son sulfate (DHEA-S).

I.B.3. Détoxication des produits secondaires de la stéroïdogenèse

L'isocaproaldéhyde, issu du clivage de la chaîne latérale du cholestérol par CYP11A1 (P450scc) au niveau de la membrane mitochondriale interne, est un aldéhyde toxique pour la cellule. Il peut être dégradé en dérivé alcoolique par des enzymes de la famille des aldo-céto réductases ou oxydé par les aldéhydes déshydrogénases (Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999; Matsuura *et al.*, 1996). Notre équipe a montré que la réduction de l'isocaproaldéhyde dans les cellules cortico-surrénaliennes murines Y1 (les différentes lignées cellulaires de la cortico-surrénale seront décrites en détail § II.) était essentiellement assurée par l'aldose réductase AKR1B7 (Aldo Keto Reductase 1B7 ou MVDP : Mouse Vas Deferens Protein), dont l'expression est induite par l'ACTH via l'AMPc (Aigueperse *et al.*, 1999; Aigueperse *et al.*, 2001; Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999). L'expression d'un anti-sens afin d'invalider l'expression de AKR1B7 dans les cellules Y1 entraîne une augmentation de la mortalité de ces cellules (Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999). Chez l'homme, cette fonction est prise en charge, au moins en partie, par l'aldose-réductase (AKR1B1), dont l'expression est aussi stimulée par l'AMPc (Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004).

I.C. Le mode d'action de l'ACTH

I.C.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien

La sécrétion des glucocorticoïdes est contrôlée par des interactions hormonales entre l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande surrénale et par des stimuli nerveux (Orth and Kovacs, 1998). En situation physiologique, le CRH (Corticotropin Realeasing Hormone) et l'AVP (Arginine VasoPressine) d'origine hypothalamique sont les principaux stimuli des cellules corticotropes antéhypophysaires qu'ils atteignent après avoir été déversés dans le système porte-hypothalamo-hypophysaire.

Ces neuropeptides (CRH et AVP) stimulent la synthèse de la pro-opiomélanocortine hypophysaire (POMC) et son clivage protéolytique aboutit à la production d'ACTH et d'autres

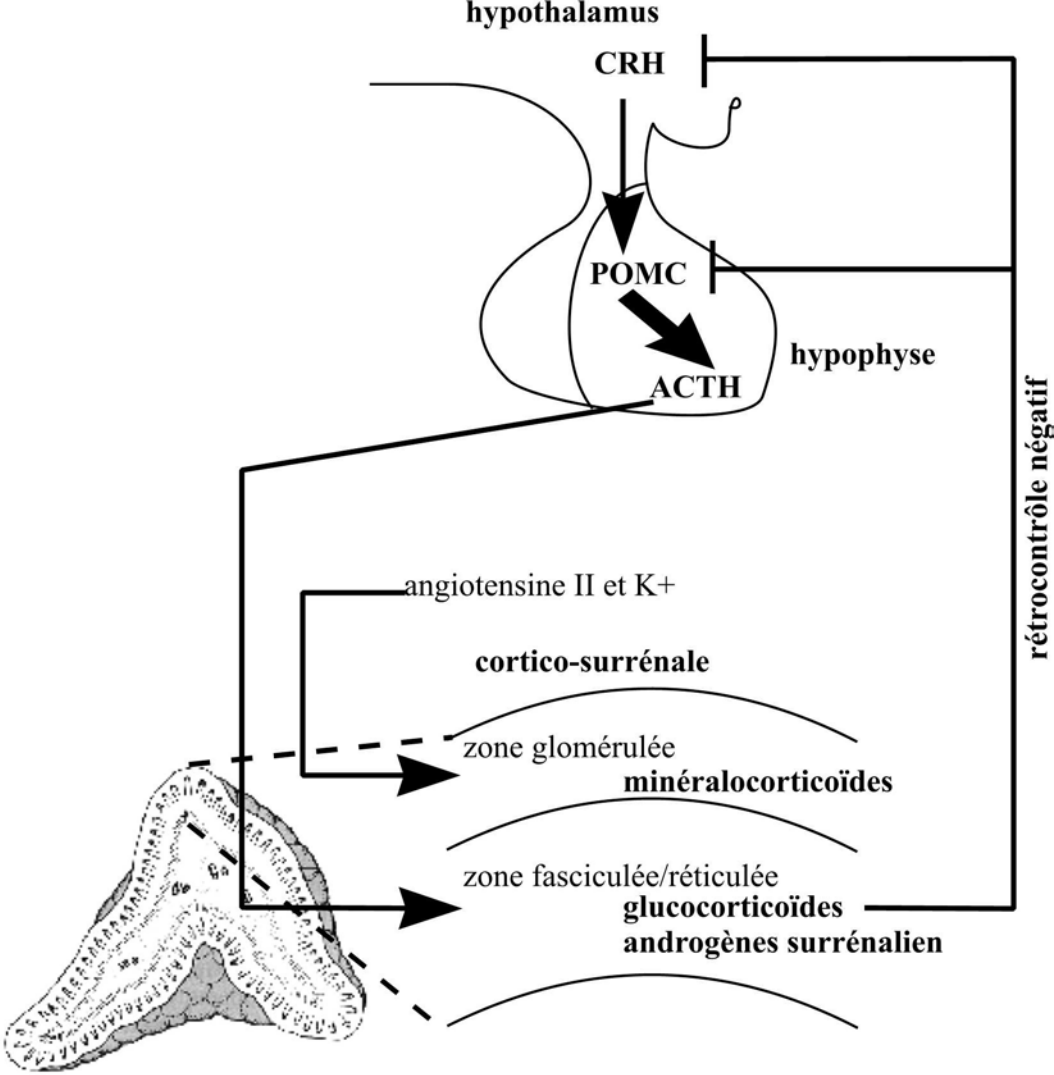


Figure 6: L'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien.
Le CRH libéré par l'hypothalamus au niveau de l'éminence médiane hypophysaire va induire le clivage de la POMC et la libération de l'ACTH dans le sang. L'ACTH stimule la fonction surrénalienne. Elle joue un rôle mineur dans la synthèse des minéralocorticoïdes, mais un rôle essentiel pour la synthèse des glucorticoïdes produits par la zone fasciculée et réticulée. En retour, les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur leur prope synthèse en inhibant la synthèse d'ACTH dans l'hypophyse, et dans une moindre mesure, en diminuant l'accumulation de l'ARNm du CRH au niveau de l'hypothalamus.

peptides (ß-LPH, ß-endorphine, etc...) en quantité équimolaire (Figure 5) (Whitfeld *et al.*, 1982). Le CRH est le régulateur physiologique majeur de la sécrétion d'ACTH, mais d'autres facteurs, comme les catécholamines, la sérotonine, peuvent être impliqués dans ce processus (Antoni, 1986; Jones and Gillham, 1988; Vale *et al.*, 1983). L'action du CRH se traduit essentiellement par une augmentation de la sécrétion d'ACTH mais aussi par une induction de la synthèse d'ARNm *POMC* dans les cellules corticotropes (Bruhn *et al.*, 1984; Watanabe and Orth, 1987). L'AVP est un faible stimulateur de la sécrétion d'ACTH, mais il potentialise l'action du CRH (DeBold *et al.*, 1984).

La liaison de l'ACTH à son récepteur membranaire, MC2R (MelanoCortin 2 Receptor), au niveau des cellules cortico-surrénaliennes, active des protéines G qui couplent le récepteur à l'adénylate cyclase et induit, via la voie de l'AMPc, la synthèse et la sécrétion de glucocorticoïdes ainsi que des effets prolifératifs (cette voie de signalisation, impliquant d'une façon plus générale les récepteurs à sept domaines transmembranaires, est décrite en détail § I.C.3.).

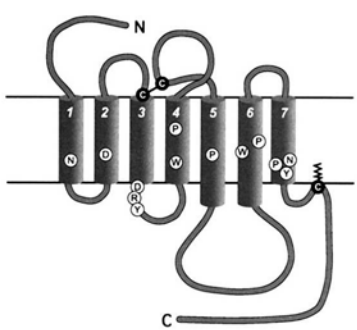
Les glucocorticoïdes inhibent leur propre synthèse en agissant sur la production d'ACTH (Figure 6). Ils inhibent, au niveau de l'hypophyse antérieure, la transcription du gène *POMC*, la sécrétion d'ACTH et l'expression du récepteur CRH (Lundblad and Roberts, 1988). De plus, au niveau des noyaux para-ventriculaires de l'hypothalamus, ils diminuent l'accumulation des ARNm *CRH* (Beyer *et al.*, 1988; Davis *et al.*, 1986). L'inhibition transcriptionnelle des gènes *CRH* et *POMC* passe par l'intermédiaire du récepteur aux glucocorticoïdes, GR (Glucocorticoid Receptor), qui se fixe sur des nGRE (negative Glucocorticoid Response Element) présents dans les séquences régulatrices de ces gènes (Dostert and Heinzel, 2004; Drouin *et al.*, 1993; King *et al.*, 2002).

I.C.2. Effets aigus et chroniques de l'ACTH

Les études physiologiques ont permis de distinguer deux modes d'action de l'ACTH :

- **La réponse aigue (ou immédiate) à l'ACTH**

Suite à l'administration d'ACTH par voie intra-veineuse, les concentrations plasmatiques de cortisol (chez l'homme) augmentent dans les quinze minutes et atteignent un niveau maximal après soixante minutes (Miller, 1995). Cette réponse consiste en un afflux de cholestérol libre vers la membrane mitochondriale interne. La protéine StAR est la principale cible de la régulation précoce par l'ACTH (Jefcoate *et al.*, 1987; Stevens *et al.*, 1993; Stocco



Famille A: rhodopsine ou type B2 adrénergique

Amines biogènes: adrénaline, sérotonine, dopamine, acétylcholine et histamine

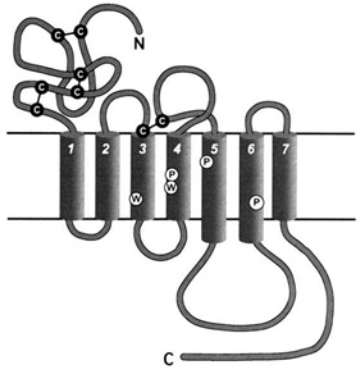
Cholécystokinine, endothéline, tachykinine, neuropeptide Y, TRH, neurotensine, bombésine, ghreline et opsines des vertébrés

Opsines des invertébrés et bradychinine

Adénosine, cannabis, mélanocortine et récepteurs olfactifs

Chémokinine, formyl-peptide, fraction du complément C5A, GnRH, eicosanoïde, leucotriènes, FSH, LH, TSH galanine, nucléotides, opiacés, ocytocine, vasoprésine, somatostatine et protéinase activée

Mélatonine



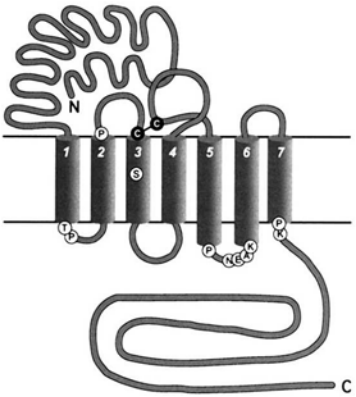
Familles B : glucagon, VIP ou type calcitonine

Calcitonie, CGRP et CRH

PRTH, PTHrP

Glocagon, GLP, GIP, GHRH, PACAP, VIP et sécrétine

Latrophiline



Familles C : senseur du calcium ou mélabotropique

GABA métabotropique

Senseurs du calcium

Phéromornes voméronasales

Goût

Figure 7: Structure schématique des trois principales familles de récepteurs couplés aux protéines G (d'après Gether, 2000).

and Clark, 1996). L'ACTH activerait aussi la voie du NO (Nitric Oxide) conduisant à la libération de la corticostérone stockée dans des vésicules (Mohn *et al.*, 2005).

- **La réponse chronique (ou tardive)**

L'administration d'ACTH pendant plusieurs jours ou plusieurs semaines conduit à une augmentation de la masse cortico-surrénalienne, du nombre de cellules (hyperplasie), de la taille des cellules (hypertrophie) et de la quantité d'enzymes de la stéroïdogenèse, rapportée à une cellule (Miller, 1995). Suite à une hypophysectomie ou à un traitement par les glucocorticoïdes, le niveau plasmatique d'ACTH diminue, ainsi que les concentrations protéiques de l'ensemble des enzymes de la stéroïdogenèse. Une déficience prolongée en ACTH entraîne également une atrophie de la glande surrénale. Ces changements sont réversibles par l'administration d'ACTH durant quelques jours. L'effet chronique essentiel de l'ACTH est l'augmentation de la transcription et de la synthèse des enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse (DuBois *et al.*, 1981; Kramer *et al.*, 1982; Kramer *et al.*, 1983; Zuber *et al.*, 1985).

I.C.3. Récepteur à l'ACTH et voie de l'AMPc/PKA

I.C.3.a. MC2R (melanocortin 2 receptor)

L'intermédiaire intra-cellulaire du récepteur à l'ACTH, MC2R, est l'AMPc (Simpson and Waterman, 1988). Il est capable de mimer à lui seul les effets de l'ACTH sur la synthèse des hormones stéroïdiennes (Hanukoglu *et al.*, 1990; Kramer *et al.*, 1984).

Le récepteur MC2R appartient aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) également appelés récepteurs à sept domaines transmembranaires. Il existe 3 grandes familles de RCPG (Figure 7) (Gether, 2000). La famille A contient, entre autre, de nombreux récepteurs aux hormones hypophysaires (FSH, LH, mélanocortine…), dont le récepteur à l'ACTH (MC2R).

Le gène *MC2R* est essentiellement exprimé au niveau du cortex surrénalien. La présence de son ARNm a été détectée par RT-PCR au niveau de la peau humaine, mais la protéine elle-même n'a pas été mise en évidence (Slominski *et al.*, 1996). Chez la souris, le gène *mc2r* est aussi exprimé dans le tissu adipeux. Cela a été démontré en utilisant de l'ACTH marquée (Grunfeld *et al.*, 1985) ainsi que par RT-PCR et northern-blot, alors qu'il est indétectable par RT-PCR dans les adipocytes humains (Boston and Cone, 1996). Cette expression de *mc2r*

dans le tissu adipeux murin est faible par rapport à celle du cortex surrénalien. Dans des cultures primaires humaines et dans des lignées cellulaires cortico-surrénaliennes humaine et murine, l'ACTH conduit à une augmentation du nombre de récepteur MC2R et du taux de ses ARNm (Lebrethon *et al.*, 1994; Mountjoy *et al.*, 1994; Mountjoy *et al.*, 1992). Parmi les facteurs de transcription nécessaires à l'expression du gène *MC2R*, SF-1 est impliqué dans l'expression basale et induite par la voie de l'AMPc (Blondet *et al.*, 2004; Cammas *et al.*, 1997; Marchal *et al.*, 1998; Naville *et al.*, 1999).

De nombreuses mutations dans le gène codant le récepteur MC2R ont été décrites dans le cadre d'une insuffisance surrénalienne primaire, le déficit familial isolé en glucocorticoïdes (syndrome héréditaire de résistance à l'ACTH, familial glucocorticoid deficiency ou FGD) (Clark, 1998; Elias *et al.*, 2000). Ces mutations conduisent à des anomalies de liaison à l'ACTH ou de couplage à la voie de l'AMPc. Le cortex surrénalien des patients atteints est désorganisé, avec absence des zones fasciculée et réticulée (Elias *et al.*, 2000).

Le séquençage du gène *MC2R* mené lors de deux études qui portaient essentiellement sur des adénomes (tumeur bénigne) sécrétants n'a pas révélé d'anomalies (Latronico *et al.*, 1995; Light *et al.*, 1995). A ce jour, seulement deux mutations activatrices ont été rapportées. La première a été identifiée chez un patient atteint d'un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH sans masse surrénalienne associée. Cette mutation est une substitution d'une phénylalanine par une cystéine en position 278 (F278C). *In vitro*, elle est associée à une désensibilisation et une internalisation du récepteur plus faible et à une élévation de l'activité basale de la voie de l'AMPc (Swords *et al.*, 2002). La deuxième anomalie, rapportée par la même équipe, concerne un patient qui présentait une hypersensibilité à l'ACTH. Deux mutations (C21R et S247G) dans le même allèle ont été décrites pour ce patient. De façon surprenante, les mutations prises une à une donnent un récepteur inactif alors que la présence des deux mutations dans la même protéine conduit *in vitro* à une augmentation de l'accumulation basale d'AMPc (Swords *et al.*, 2004).

I.C.3.b. Les protéines G

Les protéines G, appelées aussi GTPases, sont des protéines qui fixent les nucléotides à guanine et catalysent leur hydrolyse. Dans la famille des GTPases, on distingue :

- les petites protéines G de faible masse moléculaire (20-35kDa), classées en cinq familles, Ras, Rho/Rac/Cdc42, Rab, Sar1/Arf et Ran. Ces protéines sont impliquées dans

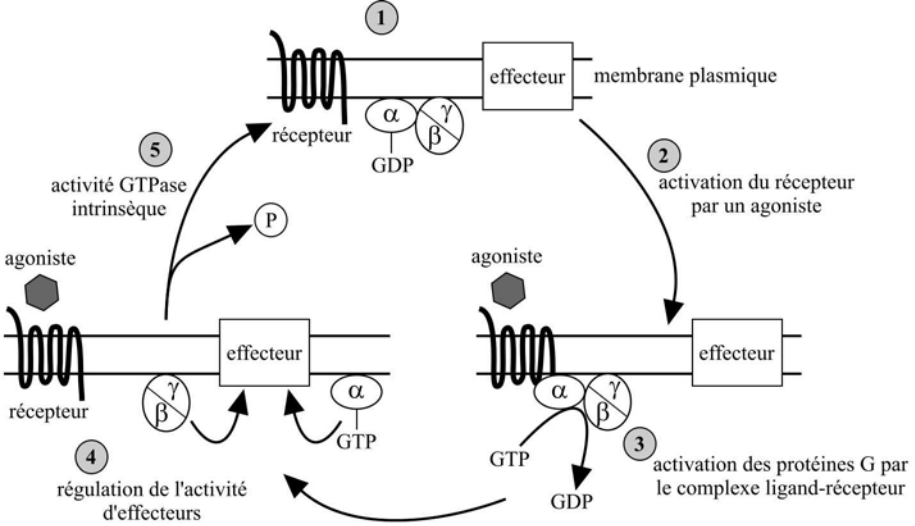


Figure 8: Activation des protéines G : le cycle GTPase (d'après Casey et al, 1988)

Le signal apporté par le stimulus extracellulaire est transduit à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire du récepteur. Le récepteur transmet l'information aux protéines G intracellulaires qui, à leur tour, activent ou inhibent des effecteurs intracellulaires.

Un RCPG au repos (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine G hétérotrimérique (sous-unités Gα et Gβ/γ) intracellulaire (3). Les sous-unités vont aller réguler l'activité de divers effecteurs (4) membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité Gα, entraîne la réassociation des sous-untités Gα et Gβ/γ (5) et le retour à l'état initial (1).

Tant que le récepteur est activé par son ligand, et tant que le système ne subit pas une désensibilisation, le cycle d'échange du GDP par du GTP continue.

différentes fonctions comme la régulation de la transcription de gènes, l'organisation du cytosquelette, le trafic intracellulaire… (Matozaki *et al.*, 2000).

- les protéines G "hétérotrimériques", liées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires (RCPG pour Récepteurs Couplés aux Protéines G).

Les protéines G "hétérotrimériques" sont composées de trois sous-unités polypeptidiques différentes :

- la sous-unité a qui fixe et hydrolyse le GTP (Guanosine TriPhosphate).
- les sous-unités ß et ? qui sont liées à la face interne de la membrane plasmique des cellules.

Il existe de nombreuses isoformes de chacune de ces sous-unités. Les multiples possibilités d'association de ces différentes isoformes permettent une grande variété de protéines G dont les effets sont différents. La spécificité d'association de chaque protéine G avec un RCPG d'une part et avec un effecteur d'autre part conditionne la spécificité de transduction membranaire des messages hormonaux par ces voies .

Quand la sous-unité Ga est liée au GDP (Guanosine DiPhosphate), elle est associée au dimère Gß/? et l'ensemble constitue un hétérotrimère inactif. Les différentes étapes de la transduction membranaire des messages hormonaux par cette voie sont schématisées sur la figure 8 et se déroulent de la manière suivante (pour revue : (Casey *et al.*, 1988)):

En premier lieu, l'hormone ou un agoniste se fixe spécifiquement à son récepteur à sept domaines transmembranaires (RCPG). Cette liaison provoque l'interaction de ce dernier avec la protéine G dont la sous-unité Ga est liée au GDP. Cette association agoniste-récepteur avec la protéine G affaiblit considérablement la constante d'association du GDP pour la sous-unité Ga, et en même temps augmente celle du GTP pour cette même sous-unité. De ce fait, si du GTP est présent, il se produit un échange entre GDP et GTP sur le site de la sous-unité Ga. Une fois le GTP fixé sur Ga, la sous-unité a est active, elle se dissocie du récepteur et du dimère ß/?. Il est à noter que le complexe agoniste-récepteur peut interagir à nouveau avec une molécule de protéine G. Ceci peut se reproduire un grand nombre de fois et provoque donc une amplification du signal hormonal. L'état actif de Ga est maintenu jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé par l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité Ga, stimulée par des

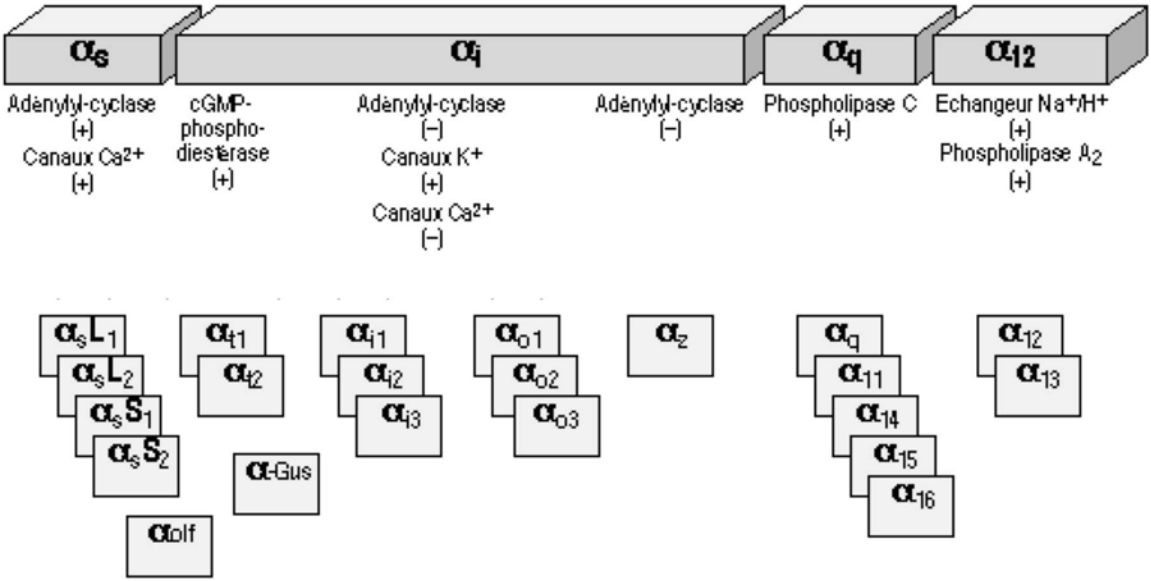


Figure 9: Diversité des sous-unités Gα des protéines G (d'après Bockaert et al, 1998).

Les protéines Gα peuvent être réparties en quatre classes, en fonction des homologies de séquence : $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12}$.

La classe $G\alpha_s$ ("s" pour : stimulant l'adénylate cyclase) est composée de quatre types de sous-unités $G\alpha_s$ (issues d'épissages alternatifs au niveau des exons 2, 3 et 4), et de la protéine Golf, spécifique de l'épithélium olfactif.

La classe $G\alpha_{i/o}$ ("i" pour : inhibant l'adénylate cyclase) comporte les deux types de transducine $G\alpha_{t1}$ et $G\alpha_{t2}$ (des cellules en bâtonnet et en cône de la rétine), trois sous-unités $G\alpha_i$, trois sous-unités $G\alpha_o$ ("o" pour : other) et la sous-unité $G\alpha_z$.

La classe $G\alpha_{q/11}$ est constituée de $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$.

La classe $G\alpha_{12}$, enfin, est formée des sous-unités $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.

Il a pu être mis en évidence que le dimère β/γ peut, lui aussi, activer ou inhiber l'activité de certains effecteurs comme certaines adénylates cyclases, des canaux ioniques, ou encore la voie ras-MAP kinases.

protéines spécifiques, les RGS (Regulators of G-protein Signalling). Sous stimulation par les RGS, les sous-unités Ga hydrolysent le GTP qui leur est associé en GDP. Cette réaction entraîne leur réassociation avec le dimère ß/? et, par conséquent, leur inactivation. L'activité GTPase des sous-unités Ga est primordiale car elle évite que la stimulation des effecteurs ne se poursuive après la disparition de l'hormone de la circulation.

La plupart des fonctions transductrices des protéines G sont détenues par la sous-unité a. Cependant, bien que la fonction principale des complexes ß/? soit la régulation de l'activité des sous-unité a, ils peuvent être couplés à des effecteurs distincts (Vanderbeld and Kelly, 2000).

La nature de la sous-unité a et l'effecteur contrôlé par la protéine G ont permis la classification suivante (Figure 9) (Bockaert and Pin, 1998; Wong, 2003):

- les protéines Gas (stimulation de l'adénylate cyclase, AC, décrite § I.C.3.c.)
- les protéines Gai (inhibition de l' adénylate cyclase)
- les protéines Gaq (activation de la phospholipase C)
- Ga12/13 (régulation des échanges Na/K).

Diverses toxines affectent le fonctionnement des protéines G. La toxine du choléra (produite par la bactérie *Vibrio cholerae*) modifie la sous-unité Gas de la protéine Gs de telle sorte qu'elle se trouve dans la même conformation que lorsqu'elle est associée au GTP. Par conséquent, elle est irréversiblement activée et stimule constamment l'adénylate cyclase. Lors d'une affection par le choléra, les cellules colonisées par *Vibrio cholerae* sont les cellules épithéliales de l'intestin qui, ainsi stimulées, laissent passer de grandes quantités d'eau provoquant diarrhée et déshydratation. La toxine de la coqueluche (produite par la bactérie *Bordetella pertussis*) entraîne une modification covalente de la sous-unité Gai qui entraîne non pas son activation mais son inactivation irréversible. De ce fait, la levée d'inhibition ainsi provoquée entraîne également une stimulation incontrôlée de l'adénylate cyclase. L'infection par la bactérie *Bordetella pertussis* a lieu par les voies respiratoires et les cellules épithéliales pulmonaires, ainsi stimulées, sécrètent en abondance des fluides et du mucus causant les toux caractéristiques de la coqueluche.

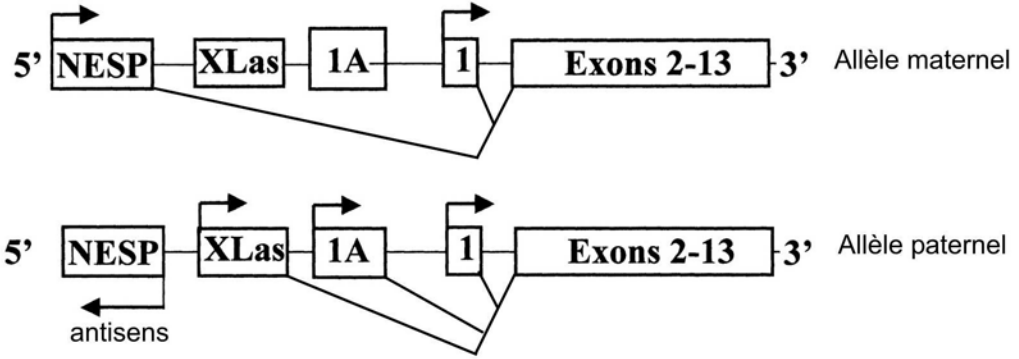


Figure 10: Empreinte parentale du gène *GNAS1*.
Plusieurs transcrits sont produits par le gène *GNAS1*.
* Le promoteur le plus en amont est situé au niveau de la séquence dénommée NESP55. Le transcrit est constitué de l'exon NESP55 et des exons 2 à 13 de *GNAS1*. Le dernier codon de l'exon NESP55 étant un codon stop, la protéine traduite est codée uniquement par l'exon NESP55. Cette protéine, connue chez les bovins et la souris, est présente dans les granules de sécrétion neuro-endocrine. Elle partage certaines homologies de structure avec la chromogranine, et s'exprime d'ailleurs dans les mêmes tissus : encéphale (neurones), hypophyse et médullo-surrénale. Son expression semble soumise à une empreinte parentale paternelle, au moins dans les tissus fœtaux, conduisant à la production d'un antisens.
* Situé entre l'exon NESP55 et l'exon 1 de *GNAS1*, se trouve l'exon XLas en amont duquel se trouve le deuxième promoteur. Lors de la transcription, l'épissage se fait de l'exon XLas à l'exon 2 de GNAS1. La protéine ainsi traduite comporte 13 exons: XLas et les 12 derniers exons de *GNAS1*. Cette protéine appartient à une famille des protéines XL pour "extra-large protein". XLas s'exprime dans la médullo-surrénale, l'anté-hypophyse et le cervelet. Dans les cellules, la protéine est localisée préférentiellement dans l'appareil de Golgi. Elle participe à la sécrétion d'autres protéines comme la toxine du choléra. De même que NESP55, l'expression de XLas semble soumise à une empreinte parentale maternelle.
* le promoteur de l'exon 1 alternatif (exon 1A) est à l'origine d'un ARNm apparemment non traduit.
* Le dernier promoteur est situé en amont de l'exon 1 de Gαs à partir duquel est transcrit l'ARNm codant la protéine Gαs. Il existe des épissages alternatifs entre différents sites donneurs et accepteurs d'epissages des exons 2 et 4, conduisant à la délétion de l'exon 3.

Le récepteur à l'ACTH, MC2R, est couplé à une protéine Gas. Cette protéine est constituée de 395 acides aminés et est codée par le gène *GNAS1*. Jusqu'en 1998, le gène *GNAS1* était décrit comme codant uniquement pour la protéine Gas responsable de la transmission du signal hormonal intra-cellulaire. Il est localisé sur le bras long du chromosome 20 en position q13.2-q13.13. Long de 20 kb (kilobase), il est formé de 13 exons et 12 introns et code pour un transcrit de 1,2 kb (Kozasa *et al.*, 1988). Il a été montré par la suite que la structure de ce gène *GNAS1* était plus complexe (Hayward *et al.*, 1998a; Hayward *et al.*, 1998b). Il possède quatre promoteurs (celui de Gas inclu, situé en amont de l'exon 1) à partir desquels sont transcrits des ARN messagers différents pouvant subir des épissages alternatifs. Ce gène a aussi la particularité d'être soumis à une empreinte parentale (Figure 10).

Les premières mutations activatrices associées aux tumeurs hypophysaires ont été identifiées dans le gène *GNAS1*, en particulier des mutations conduisant à des substitutions de l'acide aminé 201Arg convertissant *GNAS1* en l'oncogène gsp, entraînant une stimulation constitutive de l'adenylate cyclase et donc de la voie PKA, et par cet intermédiaire, de la prolifération cellulaire. Ce type de mutations activatrices est retrouvé dans des adénomes somatotropes sécrétants (Landis *et al.*, 1989), mais aussi dans des tumeurs thyroïdiennes (Suarez *et al.*, 1991) et dans de rares cas d'hyperplasie de la cortico-surrénale responsable d'un syndrome de Cushing ACTH indépendant (Fragoso *et al.*, 2003). De plus, ces mutations activatrices sont associées au syndrome de McCune-Albright associant des tumeurs endocrines, des dysplasies fibreuses des os et des lésions cutanées. Dans ce syndrome, les atteintes surrénaliennes sont relativement rares, en effet, dans une étude comportant 158 patients, seulement 9 avaient un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH associé (Ringel *et al.*, 1996).

I.C.3.c. Les adénylates cyclases (ou adénylyl-cyclases)

Les adénylates cyclases (AC) assurent, en présence de Mg^{2+}, la transformation de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) en AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) libérée dans le cytoplasme. C'est une enzyme à localisation trans-membranaire dont le site actif est intra-cytoplasmique. Neufs isoformes ont été décrites chez les mammifères (Hanoune and Defer, 2001). Les AC4, 7 et 9 ont une expression assez large alors que les autres ont une spécificité tissulaire plus ou moins marquée (Defer *et al.*, 2000). Au niveau du cortex surrénalien les AC

1 à 6 ont été détectées chez l'homme par immunohistochimie (Cote *et al.*, 1997) et chez le rat, seuls les ARNm codant pour AC5, 6 et 9 ont été identifiés par hybridation *in situ* (Shen *et al.*, 1997).

Les AC présentent toutes la même structure. Une extrémité N-terminale cytoplasmique, un groupe de 6 segments transmembranaires (M1), suivi d'un segment cytoplasmique (C1), puis un second groupe de 6 segments transmembranaires (M2), suivi lui aussi par un segment cytoplasmique (C2). C1 et C2 forment un hétérodimère avec une poche centrale dans laquelle se trouvent les sites de liaison pour l'ATP et pour deux ions Mg2+. L'hétérodimère C1/C2 présente aussi des sites de liaison pour les sous-unités Ga, mais ils se trouvent à l'extérieur de la poche.

Le complexe Gas-GTP se fixe à l'AC au niveau de l'hétérodimère C1/C2 et permet de réorienter le domaine catalytique (se trouvant à l'interface C1/C2), ce qui va permettre la liaison de l'ATP à son site de fixation qui était inaccessible jusqu'à présent (pour revue : (Hurley, 1999; Simonds, 1999)). L'effet inhibiteur des sous-unités Gai semble être la conséquence de la fixation du complexe Gai-GTP sur l'AC à proximité du site de liaison à l'ATP, le rendant de ce fait inaccessible. L'ATP, une fois fixé à l'AC, va être transformé en AMPc. Ce sont les ions Mg^{2+} qui activent la réaction conduisant à cette transformation. La forskoline (isolée à partir des racines de la plante *Coleus Forskohli*) a un effet analogue aux protéines Gas sur les adénylates cyclases. Elle se fixe sur l'AC à l'intérieur de la poche de l'hétérodimère C1/C2 et mime les effets de Gas. Le mécanisme exact de son effet positif n'est cependant pas complètement élucidé. Toutes les AC sont stimulées par Gas et la forskoline, à l'exception de l'AC9 qui ne semble pas être activée par la forskoline. Cependant, la sensibilité des AC aux autres régulateurs de leur activité diverge. La PKC stimule la plupart des AC à l'exception de l'AC4 qui est inhibée, les complexes Gß/? les stimulent (AC2, 4 et 7) ou les inhibent (AC1, et 9). Et enfin, d'une façon générale, les ions Ca^{2+} ont un effet inhibiteur sur les AC. Il semble qu'ils puissent entrer en compétition avec les ions Mg^{2+} pour leurs sites de liaison au niveau des AC.

I.C.3.d. La PKA et les relais transactivateurs de l'AMPc

L'AMP cyclique est un activateur enzymatique, notamment de la protéine kinase A (PKA) dont le rôle est de phosphoryler un certain nombre de protéines. La protéine kinase A est un tétramère composé de deux unités catalytiques et de deux unités régulatrices. La fixation

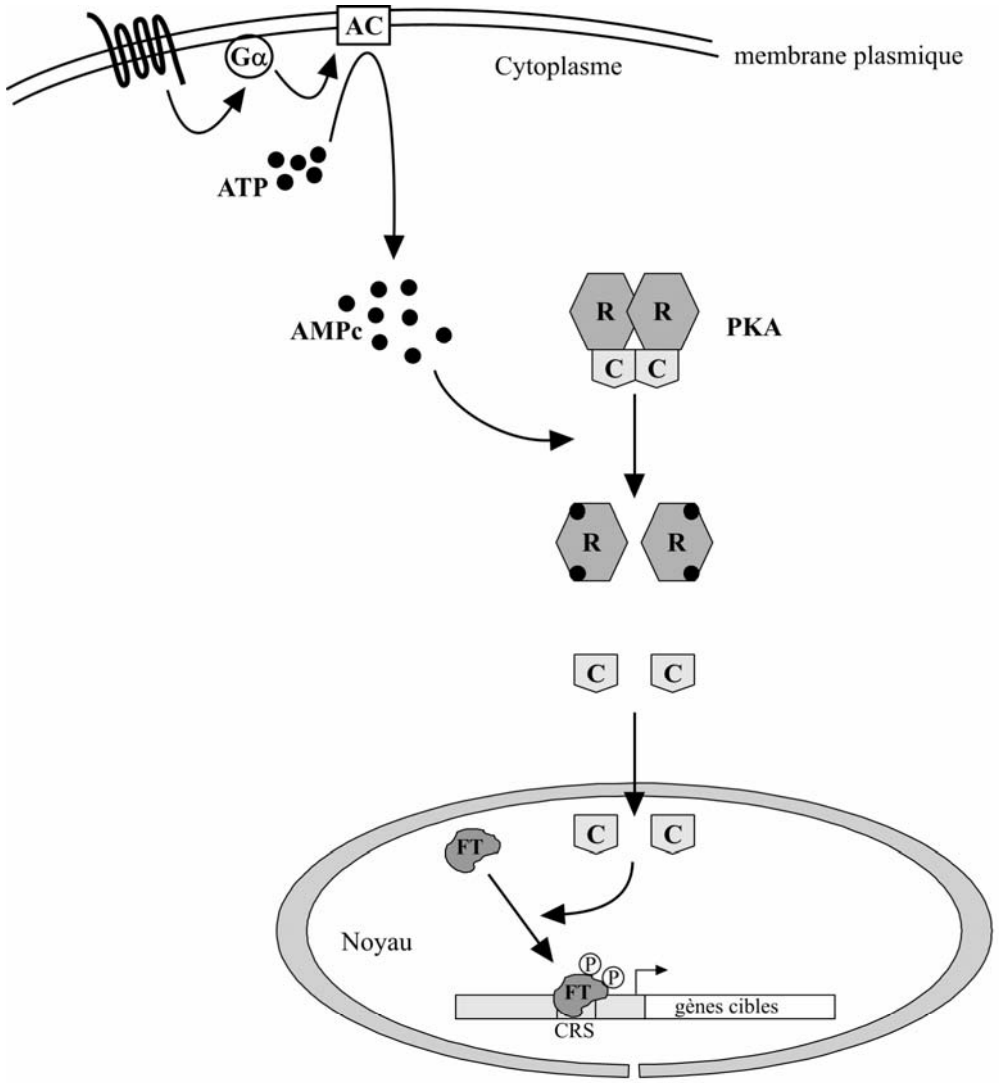


Figure 11: L'activation de la protéine kinase A
La production cytoplasmique d'AMPc peut avoir comme origine la transformation d'ATP en AMPc par l'adénylate cyclse (AC). Deux molécules d'AMPc se fixent à chaque sous-unité régulatrice (R) de la PKA induisant leur changement de conformation et libérant ainsi les sous-unité catalytique (C) active. Les sous-unités catalytiques migrent dans le noyau où elles phosphorylent et activent des facteurs transcriptionnels (FT) qui se fixent alors au niveau de gènes cibles sur des séquences de réponse à l'AMPc (CRS, cAMP-responsive sequence).

Sous-unité	gène	locus	expression	référence
régulatrices				
RIα	*PRKAR1A*	17q23-24	ubiquiste	Solberg et al, 1997
RIβ	*PRKAR1B*	7p22	tissus endocriniens et système nerveux	Solberg et al, 1991
RIIα	*PRKAR2A*	3p21	ubiquiste	Tasken et al, 1998
RIIβ	*PRKAR2B*	7q22	tissus endocriniens et système nerveux	Levy et al, 1988
catalytiques				
Cα	*PRKACA*	19p13.1	ubiquiste	Tasken et al, 1996
Cβ	*PRKACB*	1p36.1	nombreux tissus	Simard et al, 1992
Cγ	*PRKACG*	9q13	testicules	Beebe et al, 1990

Tableau 1: Les différentes sous-unités humaines de la PKA

d'AMP cyclique sur les unités régulatrices libère sous forme active les unités catalytiques qui phosphorylent des acides aminés thréonine et sérine d'autres protéines (Figure 11).

Deux isoformes sont décrites, PKA-I et PKA-II, qui se distinguent par des critères structuraux (type de sous-unité régulatrice, RI ou RII) et fonctionnels (Corbin *et al.*, 1975).

Il existe quatre sous-unités régulatrices et trois sous-unités catalytiques (tableau 1). Les sous-unités régulatrices RIa et RIIa sont d'expression ubiquiste (Solberg *et al.*, 1997; Tasken *et al.*, 1998) alors que les sous-unités RIß et RIIß sont préférentiellement exprimées dans les tissus endocrines et dans le système nerveux (Clegg *et al.*, 1988 ; Jahnsen *et al.*, 1986; Levy *et al.*, 1988; Solberg *et al.*, 1991). La sous-unité catalytique Ca a une expression ubiquiste, Cß est retrouvée dans de nombreux tissus, et C? n'est présente qu'au niveau testiculaire (Beebe *et al.*, 1990; Simard *et al.*, 1992; Tasken *et al.*, 1996).

L'activation de la PKA par l'AMPc est décrite dans la figure 11. Pour résumer, l'AMPc se fixe sur les sous-unités régulatrices, qui vont changer de conformation, conduisant à la libération des sous-unités catalytiques. Les sous-unités catalytiques libérées sont alors capables de phosphoryler les résidus sérine de nombreuses protéines cytoplasmiques ou nucléaires (Lalli and Sassone-Corsi, 1994; Roesler *et al.*, 1988; Shabb, 2001). Parmi les séquences de réponse à l'AMPc (CRS, cAMP-responsive sequence), une des mieux caractérisées est l'élément CRE (cAMP response element). La séquence CRE correspond au site de liaison de la protéine CREB (CRE-binding protein), qui est un membre des facteurs de transcription à motif « leucine zipper » qui permet de former des homodimères. L'activation de la PKA conduit à la phosphorylation de la sérine en position 133 de CREB, induisant le recrutement du co-activateur CBP (CREB-binding protein) qui contacte la machinerie de transcription.

La proportion relative des différentes isoformes PKA-I et II au sein d'un type cellulaire va conditionner la réponse à l'AMPc. En effet, l'affinité pour l'AMPc de RIIß est inférieure à RIIa et très inférieure à RIa. En conséquence, PKA-I est activée de manière transitoire par de faibles quantités d'AMPc alors que PKAII ne répond qu'à une stimulation forte et continue (Francis and Corbin, 1999; Howe, 2004). De plus, les sous-unités régulatrices de la PKA possèdent aussi un site de liaison aux protéines d'ancrage (A-Kinase Anchoring proteins ou AKAPs). L'adressage vers divers compartiments subcellulaires par les AKAPs de PKA-I et de PKA-II participe à la sélectivité fonctionnelle des PKA au sein d'une cellule donnée. La PKA est retrouvée au niveau de la mitochondrie. Son adressage vers cet organite est médié par différentes protéines AKAPs (Feliciello *et al.*, 2005). De plus, comme nous l'avons vu au paragraphe I.B.1., RIa et donc la PKA-I interagirait avec PAP7. Cette association pourrait

permettre le rapprochement de la PKA et de PBR entraînant la phosphorylation de ce dernier au niveau de la mitochondrie, permettant ainsi le transfert du cholestérol vers CYP11A1 (P450scc) pour y subir la première étape de la stéroïdogenèse (Liu *et al.*, 2003). Les AKAPs sont aussi retrouvées associées au cytosquelette. RIa est associée aux microtubules à toutes les étapes du cycle cellulaire (Imaizumi-Scherrer *et al.*, 2001). La phosphorylation des protéines associées au cytosquelette joue un rôle important dans la dynamique et l'organisation fonctionnelle de ce dernier. Les AKAPs permettent ainsi de cibler la PKA au niveau des protéines qui doivent être phosphorylées incluant l'actine et les microtubules (Tasken and Aandahl, 2004).

Les relais transactivateurs de la voie de signalisation AMPc ne se limitent pas seulement à l'activation de CREB mais font intervenir des combinaisons de facteurs dont certains sont sensibles à l'AMPc. L'ensemble de ces facteurs agissant sur un gène donné constitue des unités de réponse à l'AMPc comme la CRU (cAMP-responsive unit) du promoteur du gène *PEPCK* (phosphoenol-pyruvate carboxy-kinase), codant une enzyme limitante de la néoglucogenèse, et dont l'expression est induite par le glucagon via l'AMPc (Lamers *et al.*, 1982; Roesler, 2000). Cette unité de réponse comprend cinq sites de fixation de facteurs *trans* dont un site de fixation mixte CREB-C/EBP et trois sites de fixation propre de C/EBP (CAAT/enhancer binding protein). Le remplacement des sites de liaison de C/EBP par des sites GAL4 a permis de montrer que seules les chimères C/EBP-GAL4DBD étaient capable de transactiver le promoteur *PEPCK* en réponse à l'AMPc (Park *et al.*, 1999). Bien que le mécanisme d'activation de C/EBP par l'AMPc semble passer par l'augmentation de son expression (Nalbant *et al.*, 1998; Piontkewitz *et al.*, 1993) et/ou de ses capacités de liaison à l'ADN (Aigueperse *et al.*, 2001; Roesler, 2001), il existe aussi au moins un domaine inductible par l'AMPc dans la région N-terminale de la protéine C/EBP (Park *et al.*, 1999; Wilson and Roesler, 2002). Le facteur de transcription Sp1 (selective promoter factor 1) participe aussi au contrôle de l'expression de gènes en réponse à l'AMPc. C'est le cas par exemple des gènes *CYP11A1* et *akr1b7* qui possèdent respectivement, deux sites et un site de liaison pour les facteurs Sp1. Ces sites sont requis pour l'expression basale et induite par l'AMPc des promoteur *CYP11A1* (Ahlgren *et al.*, 1999; Begeot *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 1994; Liu and Simpson, 1997) et *akr1b7* (Aigueperse *et al.*, 2001).

Différents récepteurs nucléaires, dont SF-1 et DAX-1, sont aussi impliqués dans le contrôle des gènes de la stéroïdogenèse et dans leur réponse à l'AMPc (leur rôle dans cette régulation est discuté plus loin, I.D.3.)

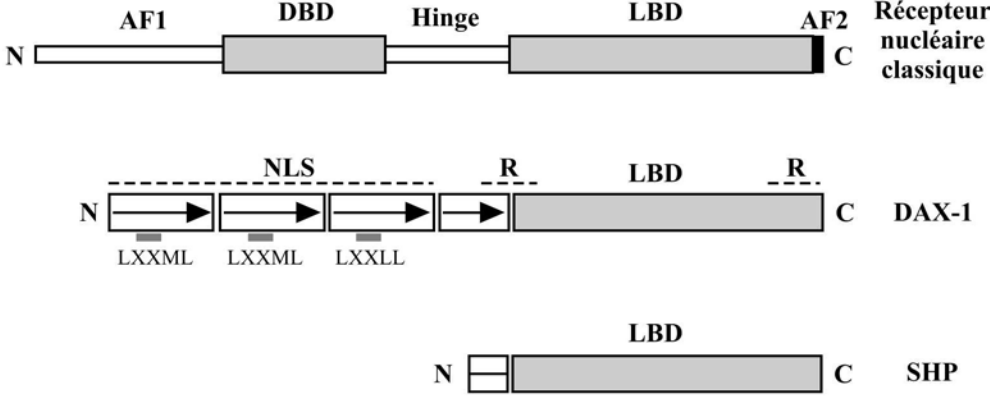


Figure 12: Structure de DAX-1

Comparaison des structures d'un récepteur nucléaire classique et de la structure de DAX-1. Contrairement à la majorité des récepteurs nucléaires, DAX-1 ne possède pas de DBD classique ni de région charnière. Ceux-ci sont remplacées par 3,5 répétitions d'un motif particulier qui permet la liaison de DAX-1 à des structures en épingle à cheveux de l'ADN ou aux ARNs. Le LBD de DAX-1 est homologue au LBD de SHP qui ne possède pas de DBD et se comporte comme un corépresseur transcriptionnel.

AF-1: activation function 1; DBD: DNA binding domain; Hinge: région charnière; LBD: ligand binding domain; AF2: activation function 2; NLS: signal de localisation nucléaire; LXXML/LXXLL: domaines d'interaction protéine-protéine également présents dans des cofacteurs; R: domaines de répression impliqués dans le recrutement des corépresseurs NCoR et Alien

I.D. Les récepteurs nucléaires, SF1 et DAX1, impliqués dans le développement et la fonction de la surrénale.

I.D.1. Caractéristiques de SF-1 et de DAX-1

Deux membres de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, DAX-1 (Dosage sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene 1) et SF-1 (Steroidogenic factor-1) (ou Ad4BP, Adrenal 4-binding protein), sont requis pour le développement normal de la surrénale et pour lui permettre d'assurer correctement ses fonctions physiologiques.

Le gène *DAX-1*, ou *NR0B1* (nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1), code pour un récepteur nucléaire orphelin exprimé dans les noyaux ventromédians de l'hypothalamus, dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse, les gonades et le cortex surrénalien. Plus de 60 familles, avec plus de 50 mutations différentes de DAX-1 ont été rapportées dans la littérature (décalages du cadre de lecture par insertion ou délétion, mutations ponctuelles non-sens ou faux-sens). Certaines mutations (perte de fonction) du gène *DAX-1* sont la cause d'hypoplasie surrénalienne congénitale humaine (AHC) et la duplication de son locus (gain de fonction), DSS (dosage sensitive sex reversal), est associée à des réversions sexuelles des patients 46XY (Muscatelli *et al.*, 1994; Zanaria *et al.*, 1994).
D'un point de vue structural, la protéineDAX-1 peut être divisé en deux parties (Figure 12) :

- Sa région carboxy-terminale est similaire au LBD (Ligand Binding Domain) de la superfamille des récepteurs nucléaires et présente une forte homologie avec SHP (small heterodimeric partner), qui est un récepteur nucléaire dépourvu de DBD (DNA Binding Domain) et exerçant une activité de répresseur transcriptionnel sur des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol par exemple (Lu *et al.*, 2000; Seol *et al.*, 1996). Aucun ligand pour DAX-1 n'a été décrit jusqu'à ce jour. Cependant, le LBD putatif de la protéine est essentiel à sa fonction de répresseur. En effet, les mutants de DAX-1 induisant la pathologie AHC, présentent une structure altérée de ce domaine carboxy-terminal, corrélée à la perte de la propriété inhibitrice (Achermann *et al.*, 2001). Plus précisément, l'élimination des onze acides aminés C-terminaux suffit à abolir sa fonction (Nakae *et al.*, 1996).
- Le domaine à deux doigts de zinc de liaison à l'ADN (DBD) retrouvé normalement dans les récepteurs nucléaires est absent de la protéine DAX-1. Il est remplacé par une

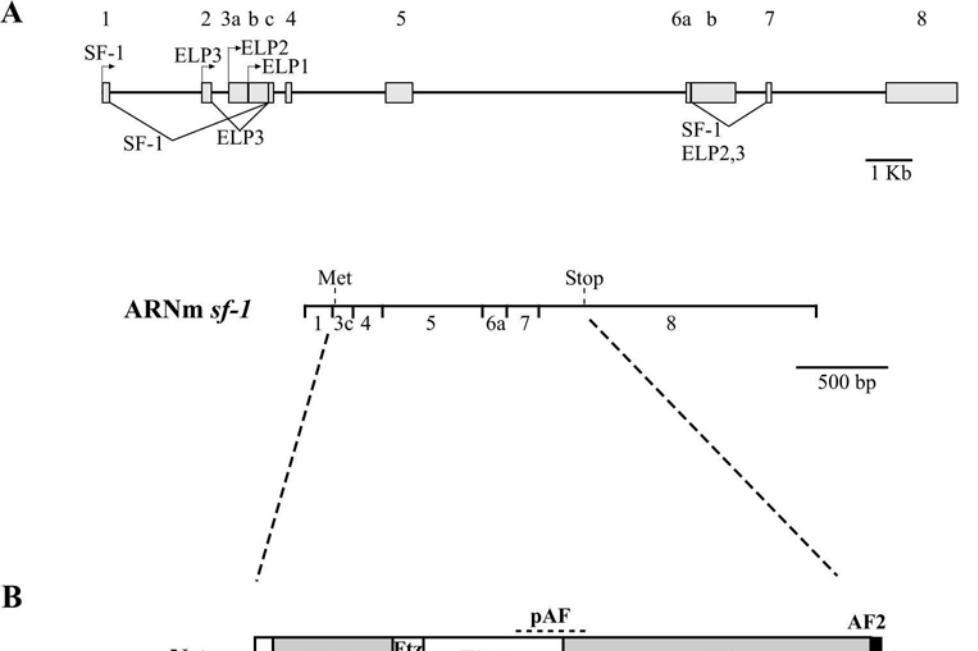


Figure 13: Structure du gène et de la protéine SF-1

A, Représentation schématique du gène murin *sf-1* d'après Parker et Schimmer (Parker et Schimmer, 1997). Les sites d'initiation de la transcription des différents transcrits sont indiqués par des flêches. Les boites grises et les chiffres au-dessus correspondent aux différents exons. Les épissages correspondant aux différents transcrits sont représentés en dessous par des traits. Seul l'ARNm *sf-1* est représenté, les chiffres correspondent aux différents exons qui le constituent.

B, Représentation de la protéine SF-1 avec différents domaines fonctionnels. DBD: DNA binding domain; LBD: ligand binding domain; AF2: activation function 2; Ftz-F1: boite Ftz-F1; NLS: nuclear localization signal; Hinge: région charnière; pAF: proximal activation function; pRD: proximal repression function; dRD: distal repression function.

structure amino-terminale constituée de trois répétitions (plus une quatrième incomplète) d'un motif d'environ 67 acides aminés, riche en alanine et glycine (Figure 12) (Zanaria *et al.*, 1994; Zazopoulos *et al.*, 1997). Ce domaine, unique jusqu'à ce jour, lui permettrait de se lier à des structures en « épingle à cheveux » (Lalli *et al.*, 1997) et d'interagir avec SF-1 (Ito *et al.*, 1997) (propriétés présentées plus loin, § I.D.3.b.).

SF-1 également nommé Ad4BP (Adrenal 4-binding protein) a été identifié par deux équipes (Honda *et al.*, 1993; Lala *et al.*, 1992) recherchant des facteurs spécifiques des tissus stéroïdogènes à partir de glandes surrénaliennes murines et bovines. Le gène codant le facteur SF-1, étant un homologue mammalien du facteur Ftz-F1 (fushi tarazu factor 1) identifié originellement chez la drosophile (Lavorgna *et al.*, 1991), a été désigné *Ftz-F1*, il est aussi appelé *NR5A1* (nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1). Ce gène code en fait quatre protéines : ELP1 (embryonic long terminal repeat-binding protein), ELP2, ELP3 et SF-1, grâce à des promoteurs et des épissages alternatifs (Parker and Schimmer, 1997) (Figure 13-A). Un groupe a montré que les trancrits *ELP1* à *3* étaient retrouvés dans tous les tissus stéroidogènes de rat (Morohashi *et al.*, 1994) alors qu'une autre équipe ne les détecte pas dans la surrénale, l'ovaire et le placenta (Sadovsky *et al.*, 1995). Bien que les ELPs puissent jouer un rôle répresseur sur l'activité de certains récepteurs nucléaires (Kotomura *et al.*, 1997; Ninomiya *et al.*, 1995), l'analyse des souris invalidées seulement pour *sf-1* a montré qu'il était à lui seul l'activateur clé de la fonction endocrine (Luo *et al.*, 1995).

SF1 présente une structure analogue à tous les récepteurs nucléaires. En effet, SF-1 comporte un DBD classique à doigts de zinc dans sa partie amino-terminale, un LBD du coté carboxy-terminal et un domaine d'activation, AF-2 (activation function 2) dans la partie carboxy-terminale qui est nécessaire à sa fonction de trans-activation (Figure 13-B). Contrairement à la majorité des récepteurs nucléaires, SF-1 se lie à l'ADN sous forme de monomère (Wilson *et al.*, 1993). Une petite région, située immédiatement après le motif en doigt de zinc, la boîte Ftz-F1, intervient dans la sélectivité de la liaison de SF-1 sur son élément de réponse (Li *et al.*, 1999). SF-1 est impliqué dans la trans-activation de nombreux gènes de la stéroïdogenèse (Val *et al.*, 2003). L'existence d'un ligand pour SF-1 n'a pas été démontrée, il a donc été classé dans la catégorie des récepteurs nucléaires orphelins. Il a été montré que les hélices 1 et 12 de son LBD sont capables d'adopter une conformation active en l'absence de ligand (Desclozeaux *et al.*, 2002). Cependant, il semblerait que des

Souris					Homme			
			sf-1	***dax-1***			***SF-1***	***DAX-1***
Hypothalamus	E11.5	prosencéphale	+	+				
	E12.5	diencéphale	+	+	Adulte	VMH	+	+
	Adulte	VMH	+	+				
Hypophyse	E13.5	adénohypophyse	+	+	Adulte	cellules gonadotropes de l'adénohypophyse	+	+
	Adulte	cellules gonadotropes	+	+				
Crête génitale mâle ou femelle (primordium adréno-génital)							-	-
	E9 à E10.5		+	-				
	E10.5		+	+				
Gonades	E11	gonades bi-potentes	+	+	33dpo	gonades bi-potentes	+	+
Testicules	E12	cellules de Sertoli/ Leydig	+	+/-	Adulte	testicules	+	+
	Adulte		+	+				
Ovaires	E13 à E18.5	ovaires	+/-	+	44dpo	ovaires	+/-	+
	Adulte	cellules de la granulosa/ thèque/ corps jaune	+	+	Adulte		+	+
Surrénales	E11	primordium surrénalien	+	+	33dpo	Primordium surrénalien	+	+
	E 13	cortex surrénalien	+	+	Adulte	cortex surrénalien	+	+
	E18.5 à 6dpp		+/-	+				
	Adulte		+	+				
Rate			+	?			+	?
Placenta			+	?			+	-

Tableau 2: Profil d'expression de SF-1 et DAX-1 au cours du développement chez la souris et l'homme. (+) indique que les transcrits sont détectés et (-) qu'ils ne le sont pas.

phospholipides puissent jouer le rôle de ligand pour SF-1 (Krylova *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

I.D.2. Sites d'expression de SF-1 et de DAX-1 (tableau 2)

De façon intéressante, les profils d'expression de DAX-1 et de SF-1 au cours du développement sont similaires.

I.D.2.a. *sf-1/SF-1*

- **Souris**

Sf1 est exprimé chez la souris dès E9 (9ème jour de développement embryonnaire) dans le primordium adrénogénital, précurseur commun des surrénales et des gonades (Ikeda *et al.*, 1994). L'expression persiste dans les deux dérivés, les ébauches surrénaliennes et gonadiques, qui se séparent progressivement de E9.5 à E10.5 et deviennent distinctes à E13 (Hatano *et al.*, 1996).

Dans la surrénale, l'expression persiste tout au long du développement sans présenter de dimorphisme sexuel et se poursuit ensuite chez l'adulte. *Sf-1* est exprimé de façon équivalente dans les différentes zones du cortex surrénalien définitif. Cependant, après E18.5 et jusqu'à 6dpp (days post partum), l'activité de liaison à l'ADN de SF-1 est pratiquement indétectable dans la surrénale de souris, et revient à des niveaux fœtaux vers 10dpp (Martinez *et al.*, 2003). *Sf1* n'est pas exprimé dans la medulla.

Dans les gonades indéterminées, l'expression de *sf-1* reste forte jusqu'à E12.5, puis disparaît dans les ovaires jusqu'à E18.5 et remonte après ce stade, alors que dans les testicules l'expression reste élevée tout au long de la gestation (Ikeda *et al.*, 1996). L'expression dans les testicules se localise au niveau des cellules stéroïdogènes de Leydig et dans les cellules de Sertoli entourant les tubules séminifères vers E15 (Ikeda *et al.*, 1994). Dans l'ovaire, chez l'adulte, SF-1 est exprimé à la fois dans les cellules de la granulosa, de la thèque et dans le corps jaune (Morohashi *et al.*, 1994; Takayama *et al.*, 1995).

Dans le système nerveux central, l'évaluation de l'expression de *sf-1* indique qu'elle co-localise avec celle de *dax-1* à 11.5dpc (days post coïtum) dans le prosencephale (Ikeda *et al.*, 1994) et dans le diencephale à 12.5dpc (Luo *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 1996), puis dans l'hypothalamus et d'adénohypophyse. Chez l'adulte, SF-1 est retrouvé dans le noyau

ventromédian de l'hypothalamus et dans les cellules gonadotropes produisant la LH de l'adénohypophyse. (Ingraham *et al.*, 1994; Shinoda *et al.*, 1995; Tran *et al.*, 2003).

Au niveau du placenta, qui est un site majeur de production de stéroïdes lors de la grossesse, l'ARNm *sf-1* n'est détecté que par RT-PCR mais pas par hybridation *in situ* ou nortern-blot (Ikeda *et al.*, 1993; Ramayya *et al.*, 1997; Sadovsky *et al.*, 1995). De plus, les souris invalidées pour *sf-1* ne présentent pas de défaut de formation du placenta ou de la synthèse de stéroïdes dans ce tissu (Sadovsky *et al.*, 1995). Les travaux de ben-Zimra *et al.* montrent que, dans le placenta, le facteur AP2 peut se substituer à SF-1 pour induire l'expression de *CYP11A1* (Ben-Zimra *et al.*, 2002).

Sf-1 est aussi exprimé dans la rate (Morohashi *et al.*, 1999). Si sa fonction dans cet organe reste méconnue, l'invalidation de *sf-1* chez la souris conduit à des défauts de formation du système vasculaire splanchnique (Morohashi *et al.*, 1999).

Il est intéressant de noter que l'invalidation du gène *m33*, appartenant à la famille Polycomb (PcG), conduit à un phénotype sensiblement identique à ce qui est observé pour la rate et la surrénale respectivement dans les souris *sf-1* -/- et dans les souris *sf-1* +/- (Katoh-Fukui *et al.*, 2005). Il est généralement admis que les complexes PcG se fixent au niveau des gènes pour permettre de conserver une structure de chromatine inactive. Cependant, il a été montré récemment que ces complexes pouvaient se retrouver au niveau de gènes actifs et être impliqués dans la formation d'une conformation de chromatine active (Kirmizis *et al.*, 2004; Ringrose *et al.*, 2004). Le complexe PcG contenant M33 est retrouvé associé au gène *sf-1* après immunoprécipitation de chromatine provenant de cellule Y1 (Katoh-Fukui *et al.*, 2005). De plus, dans les surrénales fœtales (E16.5) de souris *m33* -/-, l'accumulation de SF-1 (ARNm et protéine) est diminuée de 50% par rapport à des souris *m33* +/- et +/+. Pourtant les niveaux de M33 ne sont pas modifiés dans les surrénales fœtales des souris hétérozygotes pour *sf-1*, qui présentent une hypoplasie. Cela suggère que M33 serait requis, de façon directe ou indirecte, pour l'expression correcte de *sf-1* au cours du développement.

- **Homme**

Les données sur l'expression de *SF-1* dans les tissus stéroïdogènes chez l'homme sont plus partielles. Cependant, le patron d'expression de *SF-1* est relativement identique à celui des rongeurs.

Dans les surrénales fœtales, des analyses par immunuhistochimie indiquent que l'expression de *SF-1* a lieu dès la différenciation de l'ébauche surrénalienne et gonadique à

33dpo (days post ovulation). Son expression y est plus élevée que dans les gonades indéterminées. L'expression persiste ensuite tout au long du développement fœtal et s'étend de la zone fœtale à la zone définitive du cortex (Goto *et al.*, 2002; Hanley *et al.*, 2001).

Au niveau des gonades, l'expression apparaît dès leur individualisation du primordium adréno-génital. *SF-1* s'exprime ensuite tout au long du développement et, chez l'adulte, à la fois dans les cellules interstitielles et dans les cellules stéroïdogènes dans les deux sexes. (Goto *et al.*, 2002; Hanley *et al.*, 2001).

Comme chez la souris, *SF-1* est exprimé au niveau du noyau ventro-median de l'hypothalamus et dans les cellules gonadotropes de l'adénohypohyse.

Chez l'homme, une expression placentaire de *SF-1* a été mise en évidence par RT-PCR et par immunuhistochimie (Bamberger *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2000). De plus, SF-1 a été détecté dans la peau (Patel *et al.*, 2001) et dans la rate (Morohashi *et al.*, 1999; Ramayya *et al.*, 1997).

I.D.2.b. *dax-1/DAX-1*

Le phénotype endocrinien complexe causé par les défauts de DAX-1 est corrélé à son profil d'expression dans l'ensemble de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien/gonadique.

- **Souris**

Dans la surrénale, au cours du développement, *dax1* est exprimé dans le primordium adréno-genital à partir de E10.5, peu après *sf1* (E9). *Dax-1* continue ensuite à être exprimé dans les ébauches surrénaliennes et gonadiques après leur individualisation. Il reste exprimé dans le cortex surrénalien tout au long du développement et chez l'adulte, avec cependant un dimorphisme sexuel. En effet, chez la femelle adulte, l'expression de *dax-1* reste constante dans l'ensemble du cortex surrénalien alors que chez le mâle pubère, son expression semble diminuer et se restreindre au niveau de la zone glomérulée (Ikeda *et al.*, 1996; Kawabe *et al.*, 1999; Mukai *et al.*, 2002).

Dans la gonade mâle, l'expression de *dax-1* diminue fortement à 12dpc, au moment de la formation des cordons sexuels, alors qu'elle reste constante dans les gonades femelles (Swain *et al.*, 1996). Cette expression de *dax-1* dans les gonades est une situation opposée à celle observée pour *sf-1* dans ce même site (Ikeda *et al.*, 1996).

Chez la souris adulte, *dax-1* est exprimé dans le cortex surrénalien, les gonades mâles et femelles, les cellules gonadotropes de l'adéno-hypophyse, le noyau ventro-médian de l'hypothalamus (Ikeda *et al.*, 1996), la peau (Patel *et al.*, 2001) et la prostate (Holter *et al.*, 2002).

- **Homme**

L'expression de *DAX-1* est retrouvée au cours du développement du cortex surrénalien, des gonades, de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus mais aussi chez l'adulte dans le cortex surrénalien, dans les cellules de Sertoli et de Leydig, dans l'ovaire, dans les cellules gonadotropes, dans le noyau ventro-médian de l'hypothalamus et dans l'utérus au niveau de l'endomètre (Guo *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1996; Ikeda *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2005; Swain *et al.*, 1996). Ce patron d'expression suggère que DAX-1 est impliqué dans le développement et les fonctions de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien/gonadique.

I.D.3. DAX-1 et SF-1, acteurs aux fonctions opposées

De façon intéressante, la similitude de la distribution tissulaire de SF-1 et de DAX-1 au cours du développement puis, chez l'adulte, ainsi que les phénotypes liés à leurs mutations respectives (§ I.D.4 et 5), a conduit à penser que ces deux acteurs étaient impliqués dans un mécanisme commun, et qu'ils auraient des effets similaires. Cependant, bien que les phénotypes soient proches, ces deux acteurs n'ont pas les mêmes activités. En effet, SF-1 permet d'activer la transcription de gènes cibles alors que DAX-1 agit comme un répresseur.

I.D.3.a. SF-1, un activateur de la stéroïdogenèse.

SF-1 a été identifié sur la base de sa capacité à activer des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse (*CYP11A1*, *CYP11B1* et *CYP21*) en se fixant sur leur promoteur via des éléments de réponse de type PyCAAGGPyPy et PuPuAGGTCA (Morohashi *et al.*, 1992; Rice *et al.*, 1991). C'est la boite Ftz-F1 de SF-1 (Figure 13) qui reconnaît des nucléotides adjacents en 5' de cette séquence consensus permettant la spécificité et la stabilisation de la liaison à l'ADN. Il a été montré par la suite, essentiellement par transfection transitoire, que SF-1 participe à l'expression et à l'activation des enzymes de la stéroïdogenèse, des gènes impliqués dans le transport du cholestérol et dans la détoxication des produits secondaires au niveau surrénalien et gonadique ((Val *et al.*, 2003), pour revue). SF-1 participe aussi à

l'expression des récepteurs à l'ACTH et à la FSH (Follicle Stimulating Hormone), qui sont les hormones stimulant la stéroïdogenèse respectivement au niveau surrénalien et gonadique.

L'implication de SF-1 dans la sensibilité de l'expression des enzymes stéroïdogènes à l'AMPc n'est pas clairement établie. Les régions promotrices sensibles à l'AMPc chevauchent souvent les sites de fixation de SF-1 et la mutation de certains d'entre eux est capable d'affecter soit l'activité basale du promoteur, soit la réponse à l'AMPc, soit les deux. Ainsi, au sein du promoteur du gène *CYP11A1*, un site proximal de fixation de SF-1 (-40) est requis uniquement pour l'activation basale, alors que le site distal (-1600) est requis pour la sensibilité hormonale *in vivo* (Hu *et al.*, 2001). Des travaux réalisés par notre équipe ont montré que SF-1 participe au contrôle du gène *akr1b7* dont l'expression est dépendante de l'ACTH dans le cortex surrénalien. Le promoteur -510/+41 du gène *akr1b7* contient 3 sites de liaison pour SF-1 (-102, -458 et -503). La mutation du site -102 affecte *in vitro* et *in vivo* uniquement l'activité basale du promoteur, sans affecter sa sensibilité à l'AMPc ou à l'ACTH (Martinez *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2003; Val *et al.*, 2004) (article en annexe). La mutation du site -458 a l'effet le plus drastique puisqu'elle affecte à la fois l'activité basale du promoteur et la sensibilité à l'AMPc. Cependant, ce site -458 à lui seul est incapable de conférer une réponse à l'AMPc à un promoteur minimum (Tk). Il est donc probable que, dans le cadre du promoteur -510/+41, il coopère avec d'autres facteurs situés sur des sites adjacents. En fait, le seul élément isolé capable de répondre à l'AMPc est le site -503. Ce site lie trois complexes spécifiques. Le complexe I correspond à SF-1 sous forme monomérique, le complexe II n'est pas encore caractérisé et le complexe III correspond à SF-1 associé à une ou plusieurs protéines non identifiées. Les mutations affectant la liaison des complexe I et II au niveau du site -503 diminuent l'activité basale et la sensibilité à l'AMPc du promoteur -510/+41.

Ces données indiquent que SF-1 peut être nécessaire à la réponse à l'AMPc, mais elles montrent surtout que c'est le contexte de l'élément de réponse à SF-1 qui est important dans sa capacité à intégrer l'activation de la voie de l'AMPc au niveau des promoteurs. En effet, il a été montré par exemple qu'*in vivo*, au niveau du promoteur du gène *CYP11A1*, le site SF-1 -1600 coopère avec le CRE situé en amont (-1637) pour obtenir une réponse maximale à l'AMPc (Hu *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1994). D'autres facteurs, comme Sp1, coopèrent avec SF-1 pour transmettre la réponse à l'AMPc. Au niveau du promoteur du gène *StAR*, Sp1 interagit physiquement et fonctionnellement avec SF-1 pour permettre une activation maximale du promoteur. En effet, il a été montré que les mutations individuelles des sites de fixation de Sp1 ou de SF-1 n'affectaient que faiblement la réponse à l'AMPc alors que la

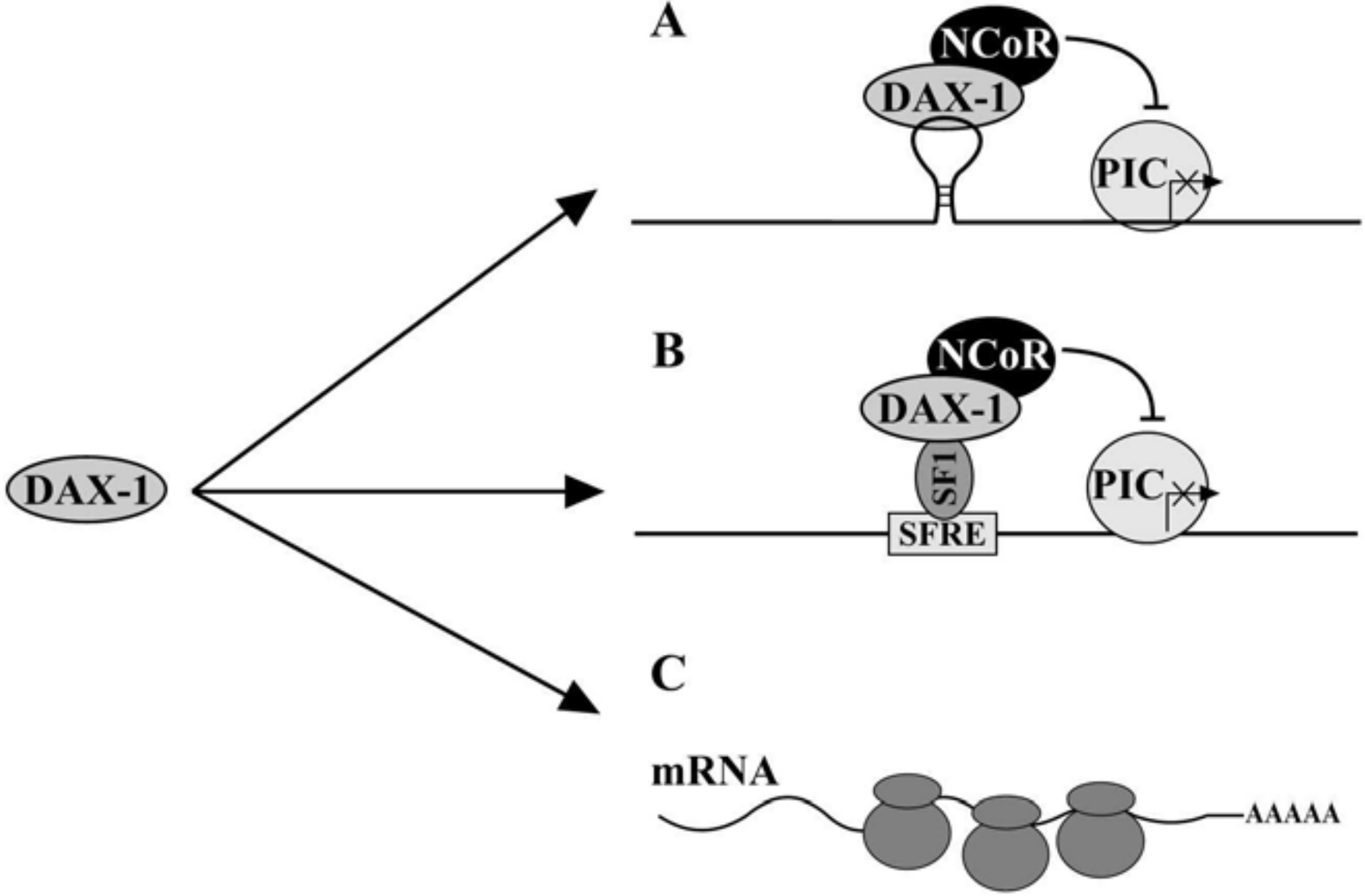


Figure 14: Les différents modes d'action de DAX-1 sur la transcription et son rôle post-transcriptionnel.

A, répression directe : DAX-1 est un répresseur transcriptionnel utilisant différents modes d'action. Il se lie à des structures en épingle à cheveux, présentes dans le promoteur de *StAR* et dans son propre pomoteur, et réprime la transcription en recrutant des corépresseurs tels que NCoR ou Alien.

B, répression indirecte: DAX-1 interagit avec SF-1 et réprime sa transactivation. Il est aussi capable d'interagir et de réprimer l'activation d'autres récepteurs nucléaires comme ER, AR et PR.

C, Interaction de DAX-1 avec des ARN poly A. Son association avec des polyribosomes suggère un rôle post-transcriptionnel de DAX-1.

combinaison des deux mutations abolit l'activité basale et induite par l'AMPc du promoteur (Sugawara *et al.*, 2000).

D'autres facteurs de transcription ainsi que des cofacteurs interagissent physiquement et/ou fonctionnellement avec SF-1 permettant l'expression spécifique de certains gènes cibles de SF-1 (pour revue (Val *et al.*, 2003)). Certaines de ces interactions permettent la répression des gènes activés par SF-1. C'est le cas pour DAX-1 dont le rôle répresseur est détaillé dans le paragraphe suivant.

I.D.3.b. DAX-1, un répresseur de la stéroïdogenèse

Les premières preuves de l'implication de DAX-1 dans le contrôle hormonal de l'expression des gènes de la stéroïdogenèse ont été obtenues dans les cellules surrénaliennes de souris Y1, exprimant de façon constitutive *DAX-1* humain. Dans ces cellules, l'expression des gènes *star*, *cyp11a1*, *3bhsd* et *akr1b7* est réprimée et il y a une absence d'induction de ces gènes par la forskoline, comparée aux cellules Y1 dépourvues de DAX-1 (Lalli *et al.*, 1998; Aigueperse *et al.*, 2001). L'expression constitutive de DAX-1 a donc un effet inhibiteur sur la stéroïdogénèse. De plus, il a aussi été mis en évidence un rôle de DAX-1 sur l'expression des gènes *CYP17* (Hanley *et al.*, 2001) et *cyp19* (Gurates *et al.*, 2003; Gurates *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). CYP19 (ou P450arom) permet l'aromatisation, au niveau gonadique, des androgènes en œstrogènes.

Les expériences menées pour disséquer les mécanismes par lesquels DAX-1 agit sur la stéroïdogenèse, suggèrent deux modes de répression transcriptionnelle possibles (Figure 14).

- Soit, il se fixerait sur des structures secondaires de l'ADN en « épingle à cheveux », retrouvées dans son propre promoteur (*dax* murin) et dans le promoteur de *StAR* (humain) (Zazopoulos *et al.*, 1997). Le domaine LBD de DAX-1 contient l'activité de répression transcriptionnelle. En effet, ce domaine LBD, lorsqu'il est apporté à l'ADN grâce à un DBD de type GAL4, est capable de réprimer l'activité d'un promoteur hétérologue de globine (Zazopoulos *et al.*, 1997).

- Soit, il interagirait avec SF-1 pour empêcher son rôle de trans-activateur. Il a été montré en système double hybride et par co-immunoprécipitation (Crawford *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1997; Nachtigal *et al.*, 1998) qu'il existe une interaction physique entre DAX-1 et SF-1, et qu'elle conduit à une interaction fonctionnelle entre les deux protéines. En effet, DAX-1 est capable de réprimer la transactivation d'un élément consensus de réponse à SF-1, en présence de SF-1, et sans liaison apparente à l'ADN (Ito *et al.*, 1997). Cette

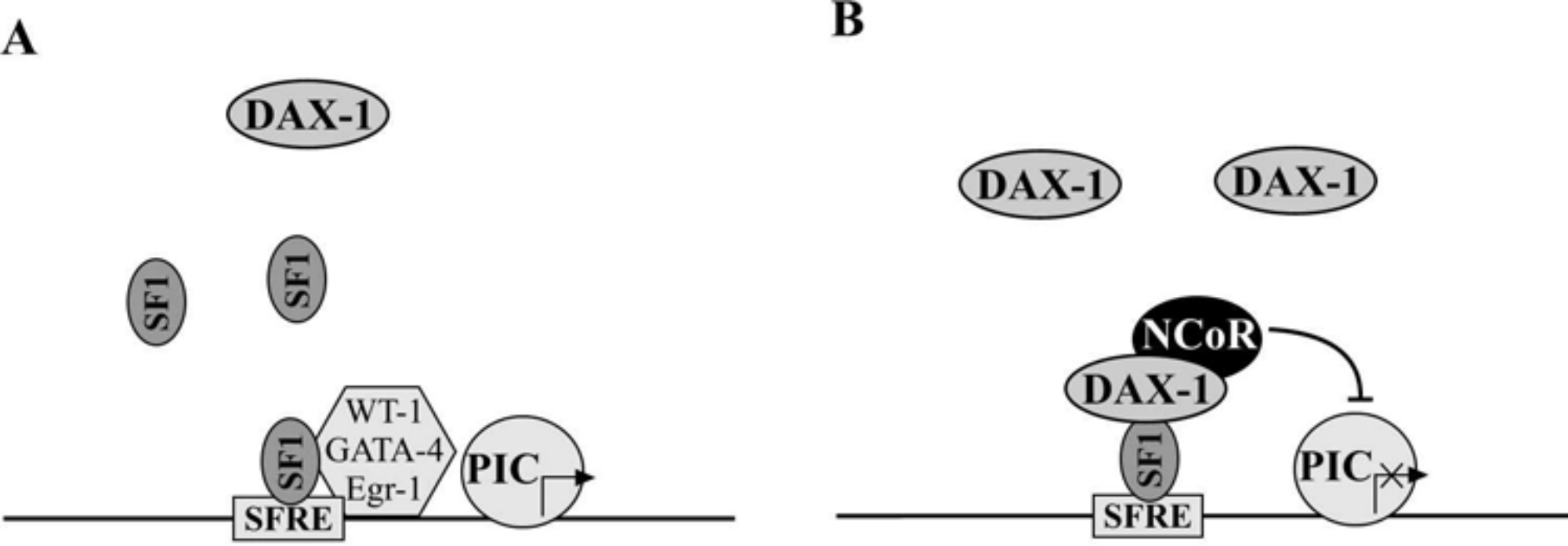


Figure 15: Contrôle de la transcription par le ratio SF-1/DAX-1.
A, Lorsque SF-1 est présent en plus grande quantité que DAX-1, il peut activer la transcription des gènes cibles et **B,** lorsque le ratio SF-1/DAX-1 diminue, DAX-1 interagit avec SF-1 et réprime sa transctivation en bloquant la synergie entre SF-1 et différents partenaires (WT-1, GATA-A, Egr-1...) et en recrutant des co-represseurs tels que NCoR et Alien.

interaction fonctionnelle a été confirmée sur les promoteurs de différents gènes cibles de SF-1 codant par exemple StAR (Zazopoulos *et al.*, 1997), CYP19 (Gurates *et al.*, 2003; Gurates *et al.*, 2002), CYP17 (Hanley *et al.*, 2001), SR-BI (Lopez *et al.*, 2001b), LHß (Luteinizing Hormone ß) (Dorn *et al.*, 1999), MIS (Mullerian Inhibiting Substance) (Tremblay and Viger, 2001), RLF (Relaxin-Like Factor) (Koskimies *et al.*, 2002)… (pour revue (Clipsham and McCabe, 2003)). Elle nécessite d'une part, une région du domaine carboxy-terminal de SF-1 et d'autre part, une région du domaine amino-terminal de DAX-1. DAX-1, une fois fixé sur SF-1, recruterait des corépresseurs, NCoR (Nuclear receptor corepressor) et Alien, permettant ainsi de les rapprocher de SF-1 et de réprimer la transcription (Altincicek *et al.*, 2000; Crawford *et al.*, 1998). L'interaction entre SF-1 et DAX-1 semble être labile, puisque le complexe SF-1/DAX-1 sur l'ADN n'a jamais été mis en évidence par des expériences de retardement sur gel (Ito *et al.*, 1997; Lalli *et al.*, 1997). Il est aussi suggéré que cette répression de DAX-1 *via* SF-1, nécessite plusieurs sites de liaison pour SF-1 dans le promoteur du gène cible. En effet, le promoteur du gène *CYP17* comporte trois sites de fixation de SF-1, requis pour son activité optimale. La mutation d'un seul SFRE (SF-1 responsive element) n'atténue que modérément la réponse à SF-1 mais abolit la répression par DAX-1. Ceci indique que l'ensemble des SFRE est nécessaire pour l'activité de DAX-1 (Hanley *et al.*, 2001).

Il semble que DAX-1 possède d'autres fonctions que la régulation transcriptionnelle. En effet, il est capable de s'associer aux ARNs et de se retrouver au niveau des polysomes dans les cellules stéroïdogènes (Lalli *et al.*, 2000). Ceci lui permettrait peut-être de jouer un rôle dans le transport et la maturation des ARNm. L'interaction avec les ARNs dépend des domaines amino-terminaux répétés. L'affinité de DAX-1 pour les ARNs semble dépendre de leur séquence, mais aucun ARN cellulaire cible de cette interaction n'a encore été décrit.

I.D.3.c. Le ratio SF-1/DAX-1

La transcription des gènes cibles de SF-1 semble être en partie réglée par les niveaux intracellulaires de SF-1 et de DAX1 et du rapport qu'il existe entre ces deux acteurs (Figure 15). Si SF-1 est présent en plus grande quantité que DAX-1, on se retrouve avec une part plus importante de SF-1 libre que de complexes SF-1/DAX-1 et les gènes cibles seront activés. Réciproquement, plus les quantités de DAX-1 augmentent par rapport à SF-1, plus l'équilibre se déplace vers le complexe SF-1/DAX-1, ce qui conduit à une répression des gènes cibles.

Ce mécanisme change aussi l'équilibre des différents partenaires (co-facteurs, co-activateurs et co-répresseurs) qui sont recrutés au niveau du promoteur. Par exemple, DAX-1 en s'associant avec SF-1, bloque sa coopération avec WT-1 (Wilms Tumor 1) (Nachtigal *et al.*, 1998), GATA-4 (GATA-binding factor 4) (Tremblay and Viger, 2001), Egr-1 (early growth response 1) (Dorn *et al.*, 1999). DAX-1, une fois fixé, interagirait avec des co-répresseurs tels que N-CoR (Crawford *et al.*, 1998), Alien (Altincicek *et al.*, 2000) et RIP140 (Receptor Interacting Protein 140) (Sugawara *et al.*, 2001), permettant de les rapprocher de SF-1 et de réprimer la transcription.

De plus, les souris présentant une invalidation hétérozygote du gène *sf-1* (+/-) et donc un rapport SF-1/DAX-1 modifié, ont un développement surrénalien défectueux conduisant à une diminution de la capacité des souris à répondre au stress, alors que l'axe hypothalamo-hypophysaire fonctionne normalement (Bland *et al.*, 2000). En fait, dès E15,5, les surrénales des souris *sf-1* +/- sont hypoplasiques et chez l'adulte, cela est associé à une augmentation de la taille des cellules de la zone fasciculée ainsi qu'à l'élévation de l'accumulation des transcrits de gènes clés pour la stéroïdogenèse, *star* et *mc-2r*. Ces compensations permettent ainsi de maintenir une production basale de corticostérone semblable à celle de souris sauvages. Ce n'est que lors d'une situation où cette production est sollicitée, comme pour répondre à un stress, qu'on observe une plus faible corticostéronémie.

Les souris invalidées pour *dax-1* présentent une meilleure sensibilité surrénalienne au stress, mesurée par la production de corticostérone ou le rapport ACTH/corticostérone, et corrélée à une augmentation de l'accumulation de P450c21 (Babu *et al.*, 2002).

La combinaison de l'invalidation de *dax-1* et de l'invalidation hétérozygote de *sf-1* conduit à une amélioration de la réponse au stress, par rapport aux souris invalidées uniquement pour *sf-1*(Babu *et al.*, 2002).

Ces résultats suggèrent que DAX-1 et SF-1 agissent, *in vivo*, de manière dépendante de la dose de l'un par rapport à l'autre.

I.D.3.d. DAX-1 et SF-1 impliqués dans la prolifération cellulaire et les tumeurs.

Prolifération et différenciation sont deux phénomènes clés de l'organogenèse au cours du développement. Des modifications de la balance qui existe entre ces deux phénomènes en faveur de la prolifération vont conduire au développement de tumeurs. SF-1 et DAX-1 jouant

un rôle déterminant dans le développement des tissus stéroïdogènes, il est important d'évaluer leur rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

SF-1 semble capable de moduler la prolifération cellulaire. En effet, après surrénalectomie unilatérale, la surrénale restante est capable de compenser le déficit induit par le développement d'une hypertrophie et d'une hyperplasie, grâce à une boucle de régulation impliquant le VMH (Ventral Medial Hypothalamus*)*. Beuschlein *et al.* se sont intéressés aux capacités de croissance de la surrénale restante après surrénalectomie unilatérale chez des souris hétérozygotes pour l'invalidation de *sf-1*. Ils ont observé une absence de croissance compensatoire chez ces souris, indiquant que SF-1 joue un rôle dans ce phénomène (Beuschlein *et al.*, 2002). De plus, une étude brésilienne effectuée sur les tumeurs infantiles du cortex surrénalien a montré une forte corrélation entre l'apparition des tumeurs et l'amplification génique de *SF-1* détectée par FISH (Fluorescent In Situ Hybridation). *SF-1* pourrait agir alors comme proto-oncogène surrénalien (Figueiredo *et al.*, 2005). Cette amplification de *SF-1* est associée à une mutation ponctuelle germinale dans le gène *TP53* (Tumor Protein p53) qui cause une déstabilisation du domaine de tétramérisation de la protéine p53 en réponse au pH, et à une perte d'hétérozygotie de *TP53* dans le tissu tumoral. Néanmoins, l'implication directe de la surexpression de SF-1 dans le déclenchement de tumeurs n'a pas été démontrée expérimentalement à ce jour.

Il a été proposé que DAX-1 puisse être impliqué dans le développement de tumeurs de différents tissus. Des niveaux élevés de DAX-1 ont été associés à des adénomes surrénaliens non fonctionnels (Reincke *et al.*, 1998) alors que de faibles niveaux de DAX-1 sont retrouvés dans les tumeurs qui sécrètent du cortisol responsable d'un syndrome de Cushing (Shibata *et al.*, 2001). DAX-1 semble donc associé au statut endocrinien des tumeurs. De plus, récemment, l'exploration des niveaux de DAX-1 par immunohistochimie sur des carcinomes ovariens a montré que la quantité de DAX-1 présente était proportionnelle à la taille, au grade et à la quantité de Ki67 (marqueur de prolifération) dans ces tumeurs. De plus, la quantité de DAX-1 dans ces tumeurs est inversement proportionnelle au pronostic de survie des patientes (Abd-Elaziz *et al.*, 2003). La relation entre la forte expression de DAX-1 et l'agressivité des tumeurs est peut être en relation avec la progestérone. En effet, l'expression de la progestérone et de son récepteur PR (progesterone receptor) au niveau des tumeurs ovariennes est corrélée à un meilleur indice de survie des patientes (Langdon *et al.*, 1998). La progestérone inhiberait la prolifération et activerait l'apoptose au niveau des cellules

Organisme	SF-1			DAX-1				
	Souris		Homme	Souris			Homme	
Génotype	***sf-1* -/-**	***sf-1* +/-**	***SF-1* m/+ ou *SF-1* m/m**	***dax-1* -/Y ou *dax-1* -/-**	***dax-1*/Y + *dax-1***	***sf-1* +/- *dax-1* -/Y**	***DAX-1* m/Y ou *DAX-1* m/m**	**2x *DAX-1*/Y**
Surrénale	-Agénésie	-Hyporéponse au stress -Défaut croissance compensatoire	-Insuffisance (agénésie ou dysgénésie)	-Fonction normale -Persistance zone fœtale		-Amélioration réponse au stress versus *sf-1* +/-	-AHC -Persistance zone fœtale	
Testicule	-Agénésie -Réversion sexuelle		-Réversion sexuelle	-Stérilité -Défauts majeurs -Augmentation aromatase -Réversion sexuelle ♀XY*	-Réversion sexuelle si Sry faible		-Hypogonadisme hypogonadotrope et primaire	-Réversion sexuelle
Ovaire	-Agénésie		-Normal	-Fertilité normale -Légères anomalies histologiques			-Hypogonadisme hypogonadotrope	
VMH	-Agénésie -Obésité liée à l'absence de VMH (8 semains)							
Hypophyse	-Défaut cellules gonadotropes							

Tableau 3: Phénotypes résultant de l'invalidation, de mutations ou de la surexpression des récepteurs nucléaires orphelins SF-1 et DAX-1.
sf-1-/- et *sf-1*+/- représentent respectivement l'invalidation homozygote et hétérozygote de *sf-1*; *SF-1*m/+ ou *SF-1* m/m correspondent à des SF-1 mutants chez l'homme, respectivement à l'état hétérozygote et homozygote ; *dax-1* -/Y invalidation de *dax-1* chez le mâle ; *dax-1* -/- invalidation homozygote de *dax-1* chez la femelle ; *dax-1*/Y + *dax-1* surexpression de *dax-1* chez le mâle ; *DAX-1* m/Y mutants humains de *DAX-1* chez l'homme ; *DAX-1* m/m mutants homozygotes humains de *DAX-1* chez la femme ; 2x *DAX-1*/Y duplication du locus DSS chez l'homme.
*, la réversion sexuelle chez les souris ♀XY est observée sur un fond génétique pur (C57BL/6JRi) (Bouma et al, 2005).

cancéreuses. En effet, la progestérone conduit dans des lignées cellulaires de carcinomes ovariens (3AO et AO) à une diminution de la prolifération cellulaire et à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 corrélé à une augmentation des ARNm *TP53* (Bu *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1998). Les résultats concernant DAX-1 suggèrent que dans les tumeurs ovariennes, il empêcherait la production de progestérone en inhibant à différents niveaux la stéroïdogenèse. Cette diminution de la production de progestérone donnerait un avantage de prolifération aux cellules tumorales (Abd-Elaziz *et al.*, 2003).

I.D.4. Invalidation de *sf-1 versus* pathologies humaines (tableau 3)

Chez la souris, l'invalidation du gène *sf-1* à l'état homozygote provoque une agénésie surrénalienne et gonadique dans les deux sexes. Indépendamment de leur génotype sexuel, les souris *sf-1* -/- présentent des organes génitaux femelles, avec oviductes, utérus et un vagin. L'absence de gonade conduit à une réversion sexuelle des souris XY, caractérisée par une persistance des dérivés des canaux de Müller résultant de l'absence des cellules de Sertoli et qui s'accompagne d'une féminisation du tractus génital liée à l'absence de testostérone (Luo *et al.*, 1994). Les souris *sf-1* +/- présentent dès E15.5 une hypoplasie des surrénales et une moins bonne réponse au stress (Bland *et al.*, 2000).

Chez l'homme, un certain nombre de mutations de *SF-1* a été décrit et contrairement aux modèles murins d'invalidation génique, les patients présentent des phénotypes plus subtils.

La mutation G35E qui touche le premier doigt de zinc du DBD de SF-1 entraîne une réversion sexuelle complète de l'individu 46XY, associée à une insuffisance surrénalienne (Achermann *et al.*, 1999). La mutation R255L dans la région charnière de SF-1 entraîne à l'état hétérozygote, une agénésie surrénalienne bilatérale, mais n'affecte pas le développement ovarien de l'individu 46XX (Biason-Lauber and Schoenle, 2000). La mutation R92Q qui touche la boîte A de SF-1 n'a pas de conséquence marquante à l'état hétérozygote mais conduit, à l'état homozygote, à des problèmes de développement surrénalien et gonadique (agénésie surrénalienne et réversion sexuelle) (Achermann *et al.*, 2002). Ces trois mutations affectent la capacité de SF-1 à se lier à l'ADN et à activer la transcription des gènes cibles, sans pour autant modifier l'accumulation de la protéine SF-1.

La mutation non-sens C16X (Mallet *et al.*, 2004) et la délétion ponctuelle D6fsX74 (Hasegawa *et al.*, 2004) conduisent à un arrêt prématuré de la traduction. Les patients atteints de ces mutations à l'état hétérozygote ne possèdent donc qu'une seule dose de SF-1 et sont caractérisés par un hypogonadisme conduisant à une réversion sexuelle mais ne présentent pas

de défaut fonctionnel de la surrénale. Cette différence par rapport aux souris *sf-1* +/- suggère que chez l'homme, une seule dose fonctionnelle de SF-1 est suffisante pour permettre le développement normal de la surrénale mais pas des gonades. Les phénotypes surrénaliens observés chez les patients ayant les mutations G35E ou R255L à l'état hétérozygote, résultent vraisemblablement d'un effet dominant-négatif des protéines mutantes.

I.D.5. Invalidation de *dax-1 versus* pathologies humaines (tableau 3)

La perte de fonction de DAX-1, chez l'homme, est responsable de l'hypoplasie congénitale des surrénales (AHC), liée au chromosome X (Muscatelli *et al.*, 1994; Zanaria *et al.*, 1994). Cette maladie héréditaire est caractérisée par un développement anormal des surrénales, correspondant à une absence de la zone définitive du cortex et la persistance d'une quantité anormale de cellules fœtales, qui crée une désorganisation structurale de la glande (Achermann *et al.*, 2001; Marsden and Zakhour, 1978). Les personnes atteintes d'AHC présentent une insuffisance surrénalienne conduisant à un déficit important en glucocorticoïdes.

A la différence de ce qui est observé chez l'homme, l'invalidation de *dax-1* chez la souris n'induit pas d'hypoplasie de la surrénale. Cependant, au niveau du cortex surrénalien, on observe le maintien d'une zone fœtale alors que celle-ci dégénère normalement à la puberté ou lors de la première grossesse chez les souris femelles. Cette anomalie ne conduit pas à des modifications des quantités circulantes de corticostérone en condition basale (Yu *et al.*, 1998), mais ces souris présentent une meilleure sensibilité surrénalienne au stress, réversée dans un contexte hétérozygote pour *sf-1* (Babu *et al.*, 2002). Cela confirme le rôle de DAX-1 comme répresseur de l'expression des gènes de la stéroïdogenèse activée par SF-1. Ces observations sont toutefois en désaccord avec le phénotype des patients atteints de l'AHC, qui présentent un déficit de la stéroïdogenèse alors que DAX-1 réprime normalement celle-ci (Lalli *et al.*, 1998).

Cette différence entre les phénotypes observés chez la souris et chez l'homme suite à l'inactivation de DAX-1 peut être expliquée par le fait que la protéine murine ne présente que 76,3% de similitude et 66,5% d'identité en acides aminés avec son homologue humain (Swain *et al.*, 1996), suggérant une évolution rapide de ces protéines et un début de divergence dans leur fonction. En effet, chez la souris, DAX-1 semble nécessaire essentiellement comme répresseur de l'activité différenciée de la surrénale alors que chez l'homme, il est requis pour la mise en place du tissu stéroïdogène surrénalien au cours du développement. Le rôle de

DAX-1 sur la fonction différenciée de la surrénale chez l'homme serait masqué par l'absence de la zone définitive du cortex.

Les individus XY, possédant une duplication du locus DSS, contenant DAX-1, développent une pathologie gonadique, caractérisée par une réversion du phénotype sexuel (Bardoni *et al.*, 1994), alors que la délétion du locus ou des mutations perte de fonction donne un phénotype mâle chez les patients XY. Ces observations suggèrent qu'un gène présent dans le locus DSS n'est pas indispensable au développement normal des testicules mais qu'une double dose de ce gène empêche la formation des testicules (Bardoni *et al.*, 1994).

Afin de reproduire cette pathologie, *dax-1* a été surexprimé chez la souris sous le contrôle de son propre promoteur (Swain *et al.*, 1998). A la différence des patients XY, les souris mâles surexprimant *dax-1* ne présentent pas de réversion sexuelle. Elles présentent simplement une stérilité mâle associée à la formation d'ovotestis au cours du développement et à un blocage de la spermatogenèse. La réversion sexuelle chez ces souris est obtenue dans un contexte *Sry* (Sex determining region on the Y chromosome) faible (allèle poschiavinus) (Swain *et al.*, 1998). SRY participe à la détermination de la gonade mâle chez les mammifères. DAX-1 pouvait donc à la lumière de ces données être considéré comme un facteur anti-testiculaire. En fait, l'absence de DAX-1 empêche la formation testiculaire. En effet, les souris invalidées pour *dax-1* présentent des défauts histologiques testiculaires marqués conduisant à une stérilité mâle (Yu *et al.*, 1998). L'invalidation de *dax-1* dans un contexte *sry* faible conduit à une réversion sexuelle des souris mâles (Meeks *et al.*, 2003). Enfin, l'invalidation seule de *dax-1* dans un fond génétique pur (C57BL/6JRi) conduit aussi à une réversion sexuelle des souris mâles (Bouma *et al.*, 2005). Cette capacité semble associée à un locus situé sur le chromosome 4 qui contient le gène *wnt4*. Il faut donc considérer *dax-1* comme un gène de détermination testiculaire agissant en parallèle ou en aval de SRY, au moins chez la souris.

II. Les lignées surrénaliennes

Il est difficile d'appréhender *in vivo* les mécanismes moléculaires régissant la physiologie d'un organe. La complexité du cortex surrénalien a conduit à développer des modèles alternatifs à l'utilisation d'animaux. Obtenir des cultures de cellules ayant les mêmes

caractéristiques que celles constituant un organe permet d'explorer plus facilement les mécanismes moléculaires.

Un certain nombre de systèmes *in vitro* ont été développés. Dans un premier temps, des suspensions de cellules surrénaliennes (Kloppenborg *et al.*, 1968) et des cultures primaires de surrénales normales et tumorales (Buonassisi *et al.*, 1962; Gospodarowicz *et al.*, 1977; O'Hare and Neville, 1973) ont été utilisées. Cependant, les cultures primaires sont souvent hétérogènes et n'étant pas immortelles lorsqu'elles sont issues d'un tissu sain, leur utilisation reste délicate.

Les cellules issues de tumeurs ont la capacité de se multiplier indéfiniment et peuvent avoir conservé certains caractères des cellules dont elles dérivent. Cette caractéristique a été utilisée pour établir par la suite des lignées cellulaires dérivées de tumeurs spontanées, soit murines (Yasumura *et al.*, 1966) soit humaines (Gazdar *et al.*, 1990). Puis, avec l'avènement de la transgenèse, il a été possible d'induire des tumeurs en ciblant l'expression d'oncogènes dans certains tissus et d'en dériver des lignées cellulaires (Kananen *et al.*, 1996a; Mellon *et al.*, 1994).

Les lignées cellulaires permettent de disposer d'une grande quantité de matériel biologique pour explorer les mécanismes de la physiologie surrénalienne. Cependant, plusieurs critères sont à rechercher afin de s'assurer de leur phénotype. Les caractéristiques considérées sont la croissance cellulaire, leur capacité à répondre aux inducteurs hormonaux et leur capacité stéroïdogénique. L'expression des enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse peut varier d'une lignée cellulaire à l'autre et conduire à la production d'hormones stéroïdes différentes de ce qui est observé *in vivo*. Toutes ces propriétés doivent être prises en considération afin d'évaluer la pertinence physiologique d'une lignée cellulaire.

II.A. Tentatives d'immortalisation des cultures primaires

II.A.1. Les cellules cortico-surrénaliennes de rongeurs

L'équipe de Auersperg *et al.* a exploré la possibilité d'établir des lignées surrénaliennes à partir de cultures primaires de cellules du cortex surrénalien de rat, en infectant les cellules avec le virus du sarcome murin de Kirsten comportant l'oncogène *Ki-ras* (Auersperg, 1978; Auersperg *et al.*, 1977; Auersperg *et al.*, 1981; Roskelley and Auersperg, 1995). Les cellules des cultures primaires sont infectées dès les passages précoces. Ainsi infectées, elles

conservent leur capacité à métaboliser la pregnénolone en progestérone indiquant qu'elles ont conservées un certain potentiel stéroïdogène. Cependant, elles sont incapables de produire les stéroïdes terminaux des différentes chaînes de synthèse. Enfin, les cellules ne maintiennent pas longtemps leur capacité stéroïdogénique et ont tendance à se dédifférencier.

II.A.2. Les cellules cortico-surrénaliennes bovines

La grande quantité de cellules retrouvées dans une seule surrénale bovine comparativement à d'autre modèle comme la souris ou le rat fait de ces cellules un outil très intéressant.

L'utilisation d'un plasmide exprimant l'antigène T (AgT) du *Simian Virus* 40 (SV40) sous le contrôle de son propre promoteur (pSV3-neo) pour tenter d'établir une lignée cellulaire cortico-surrénalienne bovine a permis de prolonger la vie des cellules en culture mais ne les a pas immortalisé (Cheng and Hornsby, 1992). Ces cellules répondent aux analogues de l'AMPc, expriment de façon inductible *CYP17* et *CYP11A* mais présentent des défauts d'expression de *CYP21* et *CYP11B1* (Cheng and Hornsby, 1992). Les mécanismes qu'emprunte l'AgT pour favoriser l'immortalisation et la transformation des cellules sont décrits plus loin dans le paragraphe II.C. et dans la figure 17.

Récemment, grâce à l'utilisation de rétrovirus, l'équipe de Hornsby *et al.* a combiné l'expression de l'AgT de SV40, de l'oncogène ras (ras^{G12V}) et de hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) pour immortaliser les cellules cortico-surrénaliennes bovines (Thomas *et al.*, 2002). L'expression de hTERT participe à la compensation du raccourcissement des télomères qui a lieu à chaque divison et ras^{G12V}, qui est une forme constitutivement active, va stimuler la prolifération cellulaire. Ces cellules ont été utilisées *in vivo* pour sauver l'insuffisance en glucocorticoïdes de souris surrénalectomisées. En effet, les cellules bovines immortalisées de cette manière sont implantées sous la capsule rénale et cette xénogreffe reconstitue un néo-tissu qui produit du cortisol et sauve les souris des effets délétères de la surrénalectomie. Cette stratégie pourrait être adaptée pour suppléer des fonctions cortico-surrénaliennes défectueuses.

II.A.3. Les cellules cortico-surrénaliennes humaines

Des tentatives d'immortalisation de cellules cortico-surrénaliennes humaines ont été menées. C'est encore l'oncogène viral AgT qui a été utilisé pour tranformer des cellules surrénaliennes fœtales (Cheng *et al.*, 1992). Ces cellules exprimant l'AgT de SV40,

continuent de répondre à l'AMPc, expriment *CYP17* et *CYP11A1* mais elles présentent des niveaux faibles d'expression de *CYP21* et *CYP11B1*. Cependant, ces cellules cultivées durant une trentaine de passage, ont ensuite cessé de se diviser. Elles ne sont donc pas totalement immortalisées, ce qui pourrait refléter l'absence de compensation par l'AgT du raccourcissement des télomères à chaque division.

II.B. Les lignées dérivées de tumeurs spontanées

II.B.1. Les cellules H295

La lignée cellulaire NCI-H295 (ou H295) a été obtenue en 1980 à partir d'un cortico-surrénalome primaire humain provenant d'une femme de 48 ans (Gazdar *et al.*, 1990). La tumeur avait une dimension de 14 x 13 x 11 centimètres (environ 4 x 2,5 x 1 pour une surrénale normale). Le tissu tumoral a été haché et la suspension obtenue a été maintenue dans divers milieux avec ou sans sérum.

La chromatographie en phase gazeuse, la spectrométrie de masse et les dosages radio-immunologiques ont été employés pour identifier les stéroïdes produits par ces cellules. Parmi les 30 stéroïdes détectés, approximativement 20 ont été identifiés. Ces cellules produisent majoritairement des androgènes (DHEA, androstènedione et testostérone) et des oestrogènes, ainsi que du cortisol, de la corticostérone et de l'aldostérone.

La présence d'une expression simultanée de *CYP11B1*, de *CYP11B2* et de l'aromatase (*CYP19*) ainsi que de leurs produits respectifs (corticostérone, aldostérone et oestrogènes) indique la coexistence dans ces cellules de plusieurs voies de production de stéroïdes spécifiques de la glomérulée, de la fasciculée et des gonades.

La lignée cellulaire H295 produit donc tous les stéroïdes surrénaliens normalement synthétisés *in vivo* par différentes zones du cortex surrénalien mais aussi par les gonades (pour revue: (Rainey *et al.*, 1994)). Elles expriment aussi les facteurs nucléaires spécifiques des tissus stéroïdogènes SF-1 et DAX-1.

L'analyse cytogénétique de ces cellules a montré qu'elles avaient un fort taux d'aneuploïdie : 30% des cellules possédaient 64 chromosomes (Gazdar *et al.*, 1990).

Cette lignée cellulaire est cultivée en suspension et a un temps de doublement relativement long (environ 5 jours). Elle est disponible auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous la référence CRL-10296.

- **<u>Les cellules H295R</u>**

Il a été appliqué aux cellules NCI-H295 une série de contraintes relatives aux conditions de culture permettant de favoriser d'une part, l'attachement des cellules aux boîtes de Pétri en plastique, et d'autre part d'augmenter la vitesse de doublement de la population cellulaire, tout en maintenant leurs fonctions stéroïdogènes (Bird *et al.*, 1993; Rainey *et al.*, 1994; Rainey *et al.*, 1993). La nouvelle lignée cellulaire ainsi obtenue a été nommée H295R pour la différencier des cellules d'origine. Tandis que les cellules NCI-H295 se développent en suspension, les cellules H295R se développent en une monocouche avec un temps de doublement de deux jours contre cinq pour les premières. Ces cellules sont disponibles à l'ATCC sous la référence CRL-2128. Les cellules de la lignée H295R produisent sensiblement les mêmes principaux stéroïdes que les cellules NCI-H295.

- **<u>Les cellules H295A</u>**

Plus tard, il a été décrit une autre lignée cellulaire dérivée des cellules NCI-H295 qui se développe également en monocouche : H295A (Rodriguez *et al.*, 1997). La méthode pour obtenir cette sous-population est similaire à celle utilisée pour isoler la lignée H295R. Cette lignée cellulaire H295A est peu caractérisée du point de vue de la réponse hormonale. Cependant, elles ont été utilisées pour comprendre des mécanismes régissant la transcription de certains gènes impliqués dans la stéroïdogenèse.

II.B.1.a. Réponse hormonale et expression des récepteurs aux hormones

Des analyses par northern-blot des différents ARNm des enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse ont montré que les cellules NCI-H295 ne répondaient ni à l'ACTH ni à l'angiotensine II (ANGII), principal activateur de la fonction minéralocorticoïde (Staels *et al.*, 1993). Cependant, l'utilisation du 8-bromo-AMPc et de la forskoline, qui stimulent la voie de la PKA mimant ainsi les effets de l'ACTH, conduit à l'augmentation de l'accumulation des ARNm des gènes *CYP11A1*, *CYP17* et *CYP21A2*. De plus, on observe une augmentation des ARNm *CYP21A2* et une diminution des ARNm *CYP17* dans des cellules NCI-H295 traitées avec des activateurs de la voie PKC (Protein Kinase C), qui est la voie de signalisation de l'ANGII dans la zone glomérulée du cortex surrénalien (Staels *et al.*, 1993). Bien que les origines de l'absence de réponse à l'ACTH et à l'ANGII n'ont jamais été recherchées

directement dans les cellules NCI-H295, nous pouvons raisonnablement imaginer que ces dysfonctionnements proviennent d'un défaut d'expression de leur récepteur respectif.

La lignée cellulaire H295R répond faiblement à l'ACTH. Cette sensibilité modérée à l'ACTH reflète la faible expression du gène *MC2R* qui code pour son récepteur (Mountjoy *et al.*, 1994). Par conséquent, la plupart des expériences sur la voie de l'AMPc menées sur les cellules H295R l'ont été en utilisant la forskoline ou des analogues de l'AMPc. La faible réponse à l'ACTH de ces cellules est donc un inconvénient majeur.

Des expériences de liaison en présence d'antagonistes spécifiques des récepteurs à l'ANGII, AT1R et AT2R (Angiotensin Receptor 1 et 2), ont montré que la lignée cellulaire H295R exprimait essentiellement *AT1R* (Bird *et al.*, 1993). Ces cellules, contrairement aux cellules NCI-H295, répondent correctement à l'ANGII et sont utilisées pour comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse à l'ANGII de la surrénale (Romero *et al.*, 2004).

L'autre régulateur physiologique principal contrôlant la production d'aldostérone par la surrénale est le potassium (K^+). Il augmente les niveaux intracellulaires de calcium dans les cellules H295R et induit une augmentation de la synthèse d'aldostérone (Pezzi *et al.*, 1996; Rainey *et al.*, 1994). Des études ont montré qu'il augmente aussi la production de l'angiotensine I et de l'angiotensine II dans les mêmes cellules, qui expriment aussi la rénine, suggérant que la lignée H295R serait un modèle d'un système intra-surrénalien rénine/angiotensine (Hilbers *et al.*, 1999).

II.B.1.b. Synthèse des stéroïdes

Les cellules NCI-H295 d'origine ainsi que les cellules H295R produisent des stéroïdes provenant normalement à la fois des zones glomérulée, fasciculée et réticulée. Cette diversité de production suggère que les H295 (NCI- et –R) ont un caractère pluripotent et que les cellules de fasciculo-réticulée et de glomérulée se différencient à partir d'un précurseur commun.

Cependant, le traitement de ces cellules avec des agonistes de l'ACTH ou avec l'ANGII favorise la synthèse des stéroïdes spécifiquement produits par les différentes zones du cortex surrénalien qui sont contrôlées respectivement par ces hormones. Le traitement avec ANG II ou le K^+ conduit les cellules à produire de l'aldostérone (Bird *et al.*, 1993; Pezzi *et al.*, 1996; Rainey *et al.*, 1994). Et l'utilisation d'activateurs de la voie de l'AMPc conduit les cellules à produire des stéroïdes normalement synthétisés par les zones fasciculée et réticulée (corticostérone, DHEA et son sulfate…) (Rainey *et al.*, 1993).

II.B.1.c. Expression des enzymes de la stéroïdogenèse surrénalienne.

Le cortex surrénalien humain est un organe endocrine complexe qui sécrète des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes et des précurseurs androgéniques surrénaliens. Ces stéroïdes sont produits par des zones distinctes. Etudier la production de ces hormones stéroïdes exigeait l'isolement de cellules de chacune des différentes zones. La lignée cellulaire NCI-H295 était la première lignée humaine de cellules surrénaliennes ayant conservé la capacité de produire des stéroïdes surrénaliens, ce qui en a fait un modèle de choix.

Les cellules NCI-H295, H295R et H295A ont été utilisées pour étudier l'expression et la régulation des gènes de la stéroïdogenèse. Elles expriment toutes les enzymes qui participent normalement à la stéroïdogenèse d'une surrénale humaine normale (Staels *et al.*, 1993). De plus, ces gènes répondent aux mêmes voies de signalisation que dans une surrénale normale. Cependant, il est à noter que ces cellules expriment les gènes codant les enzymes *CYP11B1* et *CYP11B2* qui sont normalement exprimées respectivement dans la zone glomérulée et dans la zone fasciculée/réticulée.

Elles sont les seules cellules surrénaliennes humaines immortalisées. Cependant, compte tenu du large spectre des stéroïdes synthétisés, leur utilisation pour la compréhension de la spécificité tissulaire de la stéroïdogenèse reste limitée.

Les études menées sur ces cellules issues d'un cortico-surrénalome et leur utilisation dans des modèles de xénogreffe chez la souris ont apporté des informations sur les tumeurs cortico-surrénaliennes. En effet, elles reproduisent les dérégulations du système IGF observées dans les cortico-surrénalomes humains (Logie *et al.*, 2000). Elles ont permis aussi d'évaluer l'impact de traitements anti-cancéreux (Le Blanc *et al.*, 2002).

II.B.2. Les cellules surrénaliennes de souris Y1

II.B.2.a. Origine des cellules Y1

Les cellules Y1 ont été dérivées d'une tumeur cortico-surrénalienne de souris adulte. La tumeur d'origine a été propagée dans un premier temps par transplantation intramusculaire. Lors de ces premiers passages *in vivo*, la tumeur avait un fort pouvoir métastatique. La corticostérone produite par les cultures primaires des cellules de cette tumeur, en réponse à l'ACTH, indiquait qu'elle provenait certainement de la zone fasciculée du cortex surrénalien (Cohen *et al.*, 1957a; Cohen *et al.*, 1957b). Lors des passages *in vivo* plus tardifs, la tumeur s'est moins bien développée. Les cellules ont continué à répondre à l'ACTH, mais elles

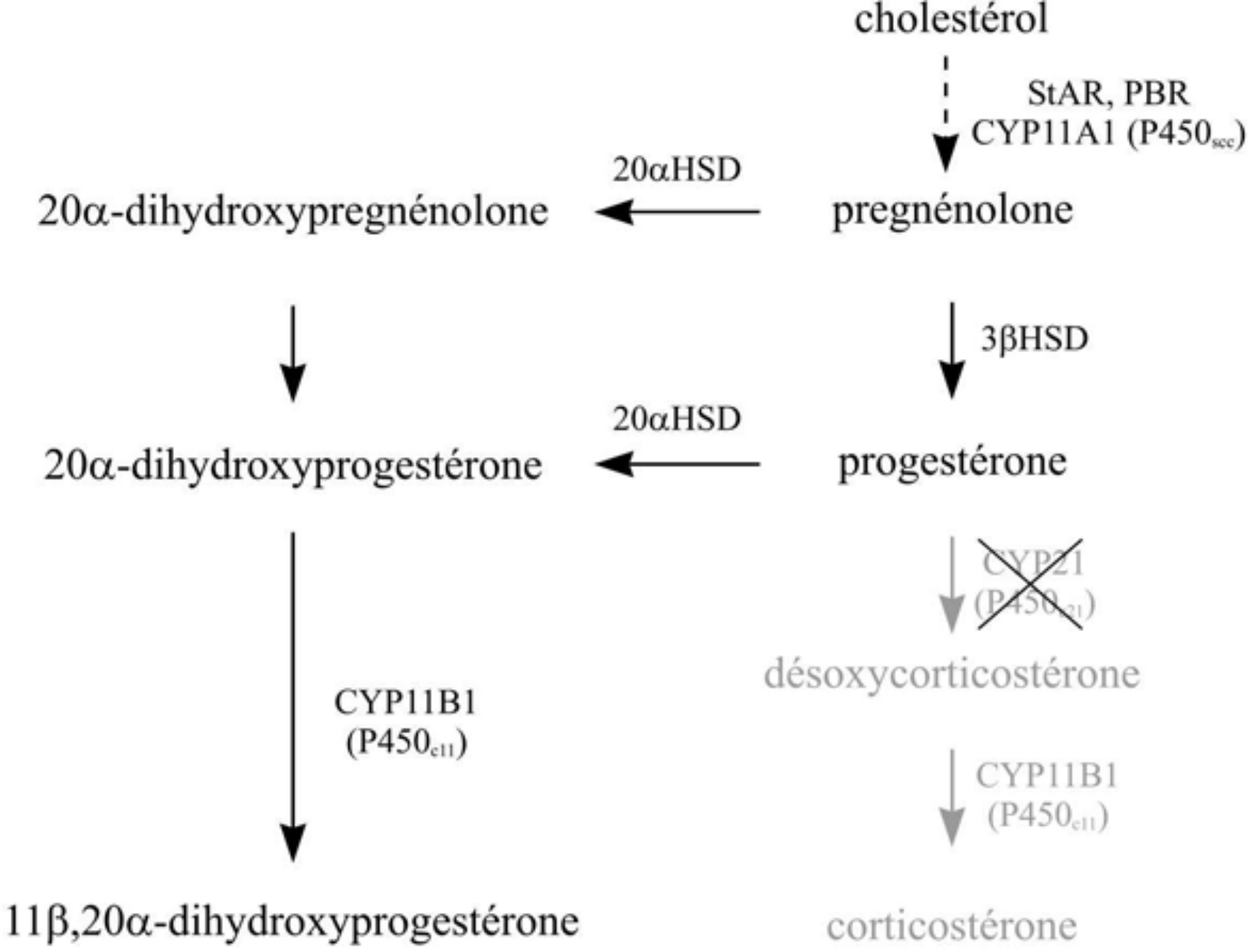


Figure 16: Voies de synthèse des stéroïdes des cellules cortico-surrénaliennes Y1. L'abence d'expression du gène *cyp21a1* (CYP21 ou P450c21) et l'augmentation de l'activité 20-keto-reductase (20αHSD) dans les cellules Y1 les conduit à produire essentiellement de la 20α-dihydroxyprogestérone et de la 11β,20α-dihydroxyprogestérone.

avaient perdu leur capacité de produire de la corticostérone (Bloch and Cohen, 1960). L'équipe de S. Gordon, en alternant les transplantations *in vivo* et les cultures *ex vivo* de ces cellules, a permis de sélectionner des cellules ayant conservé un phénotype différencié et pouvant être cultivées ensuite exclusivement en boîte de culture. La lignée de cellules ainsi établie et retenue a été nommée Y1 (Yasumura *et al.*, 1966). Elle est disponible auprès de l'ATCC sous la référence CCL-79. Ces cellules possèdent 39 chromosomes contre 40 normalement chez la souris. Cependant, elles présentent des anomalies comme un chromosome extra-long traduisant qu'il y a eu, dans ces cellules, des remaniements chromosomiques.

II.B.2.b. Stéroïdes synthétisés par les cellules Y1

Les cellules Y1 produisent essentiellement de la 20a-dihydroxyprogestérone et de la 11ß,20a-dihydroxyprogestérone (Figure 16) mais pas de corticostérone ni d'aldostérone. Ce profil de production anormal est la conséquence d'une double anomalie. En effet, il n'a pas été détecté d'ARNm du gène *cyp21a1*, ceci conduisant à un arrêt de la chaîne de synthèse au niveau de la progestérone (Parker *et al.*, 1985; Szyf *et al.*, 1990). De plus, on observe dans ces cellules une augmentation de l'activité 20-céto-reductase (20a hydroxystéroïde déshydrogénase, enzyme impliquée dans le catabolisme de la progestérone) (Pierson, 1967). Lorsque le gène *cyp21a1* est apporté de manière exogène, il y a production de corticostérone (Parker *et al.*, 1985). Ces observations suggèrent que les cellules Y1 ont une différenciation proche des cellules de la zone fasciculée. Cette hypothèse est renforcée par l'expression des gènes *cyp11b1* et *akr1b7* et par l'absence d'expression significative du gène *cyp11b2* qui sont les marqueurs respectifs des zones fasciculée et glomérulée (Aigueperse *et al.*, 1999; Domalik *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1985).

Le traitement des cellules Y1 par l'ACTH entraîne une augmentation de l'AMPc intracellulaire (Schimmer and Zimmerman, 1976). Cette augmentation d'AMPc a pour conséquence de stimuler la transcription de différents acteurs géniques de la stéroïdogénèse : le récepteur à l'ACTH *mc2r* (Mountjoy *et al.*, 1994), *cyp11a1* (Chen and Guo, 2000), *cyp11b1* (11ß-hydroxylase) (Mukai *et al.*, 1998), *star* (Clark *et al.*, 2001), *sr-b1* (le récepteur des HDL) (Temel *et al.*, 1997). Il est à noter que l'ANGII ne stimule pas la stéroïdogenèse dans les cellules Y1 (Langlois *et al.*, 1990).

II.B.2.c. Sous-clones de la lignée Y1

La lignée cellulaire Y1 est depuis longtemps cultivée dans de nombreux laboratoires de par le monde. Il y a en circulation une multitude de populations cellulaires Y1 différentes qui ont dérivé vers une perte de réponse à l'ACTH. Afin de réduire la variabilité liée à la lignée Y1, un clone a été isolé, Y1BS1 (Schimmer, 1979). Les cellules Y1BS1 continuent à répondre à l'ACTH.

- **Clones déficients en récepteur à l'ACTH**

Quatre clones résistants à l'ACTH ont été isolés et caractérisés : Y6, OS3, 10r6 et 10r9. Le clone Y6 a été isolé à partir de la tumeur d'origine comme le clone Y1. Le clone OS3 est une dérive spontanée de la lignée Y1 (Schimmer, 1969). Les clones 10r6 et 10r9 ont été isolés à partir des cellules Y1BS1 (qui est un sous-clone de la population Y1 avec un phénotype stable) pour leur capacité à se développer en présence de forskoline (Schimmer and Tsao, 1984). En effet, l'activation de la voie AMPc rend les cellules moins adhérentes et dans ces conditions la croissance des clones résistants à cette signalisation est favorisée.

Bien qu'ayant des origines différentes, ces divers clones présentent des phénotypes similaires. Ils sont déficients en AC-4 (adénylate cyclase 4)(Al-Hakim *et al.*, 2004; Rui *et al.*, 2004), ils n'expriment pas le gène codant le récepteur à l'ACTH (Qiu *et al.*, 1996) et présentent des niveaux réduits en protéines Gas et Gai (Qiu *et al.*, 1996). Cette dernière anomalie serait secondaire à la perte d'expression du récepteur à l'ACTH puisqu'on retrouve dans ces différents clones des niveaux normaux de Gas et Gai après transfection du gène *mc2r* sous le contrôle de séquences régulatrices fortes (CMV) (Qiu *et al.*, 1996). De plus, tous ces clones ont un gène *sf-1* muté qui conduit à une diminution des propriétés transactivatrices du facteur nucléaire empêchant, de ce fait, l'expression du récepteur *mc2r* ainsi que d'autres gènes comme *cyp11b1*, *star* et *cyp11a1* (Frigeri *et al.*, 2000; Schimmer *et al.*, 2003). L'activité des protéines Gß/? dans ces clones est aussi diminuée (Mitchell *et al.*, 1992) et récemment il a été montré que cette anomalie pouvait jouer un rôle important dans le phénotype de ces différents clones. En effet, dans ces clones, l'apport de Gß/? par transfection permet de restaurer l'expression du récepteur à l'ACTH et de l'AC-4 (Rui *et al.*, 2004).

- **Clones déficients pour la PKA**

Des clones mutants, issus de la lignée Y1BS1, générés par exposition à un mutagène, l'éthyl-méthyl-sulfonate (EMS), et résistants à l'AMPc ont été isolés : kin-2, kin-7 et kin-8. Un traitement prolongé des cellules Y1BS1 par l'AMPc conduit ces cellules à stopper leur prolifération et à se détacher de leur support. De ce fait, il a été facile en remplaçant régulièrement le milieu de culture de ne conserver que les cellules « résistantes » à l'AMPc, c'est-à-dire celles qui continuaient à adhérer et à proliférer. Des mutations de substitution dans la sous-unité régulatrice 1 alpha (RIa) de la PKA sont à l'origine de ce phénotype. Elles conduisent toutes à une diminution de l'affinité de la sous-unité RIa régulatrice pour l'AMPc. Chaque clone contient un allèle sauvage et un allèle muté (Olson *et al.*, 1993; Rae *et al.*, 1979; Schimmer *et al.*, 1977). Ces clones kin présentent une stéroïdogenèse réduite que ce soit en condition basale ou lors d'une stimulation par l'ACTH ou par le 8-bromo-AMPc.

Les clones kin ont été très utilisés pour évaluer l'importance de l'ACTH et de l'AMPc dans la fonction cortico-surrénalienne, en particulier la stéroïdogenèse et le contrôle de l'expression de différents gènes (*cyp21a1* (Parissenti *et al.*, 1993), *cyp11b1* (Wong *et al.*, 1989), *star* (Lopez *et al.*, 2001a),…).

En conclusion, les cellules Y1 ont été largement utilisées pour comprendre les mécanismes d'action de l'AMPc et des effecteurs intracellulaires qui stimulent la stéroïdogenèse. Bien qu'exprimant la plupart des acteurs de la stéroïdogenèse, dont *sf-1*, il manque à ces cellules l'expression des gènes *dax-1* et *cyp21a1*. Comme les cellules Y1 ne présentent pas un phénotype complet de cellules cortico-surrénaliennes il devient plus aléatoire de généraliser des résultats obtenus dans ce modèle.

II.C. Les lignées surrénaliennes obtenues à l'aide de l'oncogenèse ciblée.

La transgenèse permet, à l'aide de séquences régulatrices judicieusement choisies, de diriger l'expression d'un oncogène dans un tissu et à un stade donné du développement. Cette expression peut aboutir au développement d'une tumeur dans le ou les tissus ciblés. Cette stratégie présente de nombreux avantages. Tout d'abord, cela permet d'avoir, de manière héréditaire, des animaux développant des tumeurs constituant autant de modèles de tumorigenèse. Et enfin, en plus de permettre l'exploration des mécanismes moléculaires de la tumorisation, ces animaux peuvent conduire à la création de nouveaux outils comme des lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs.

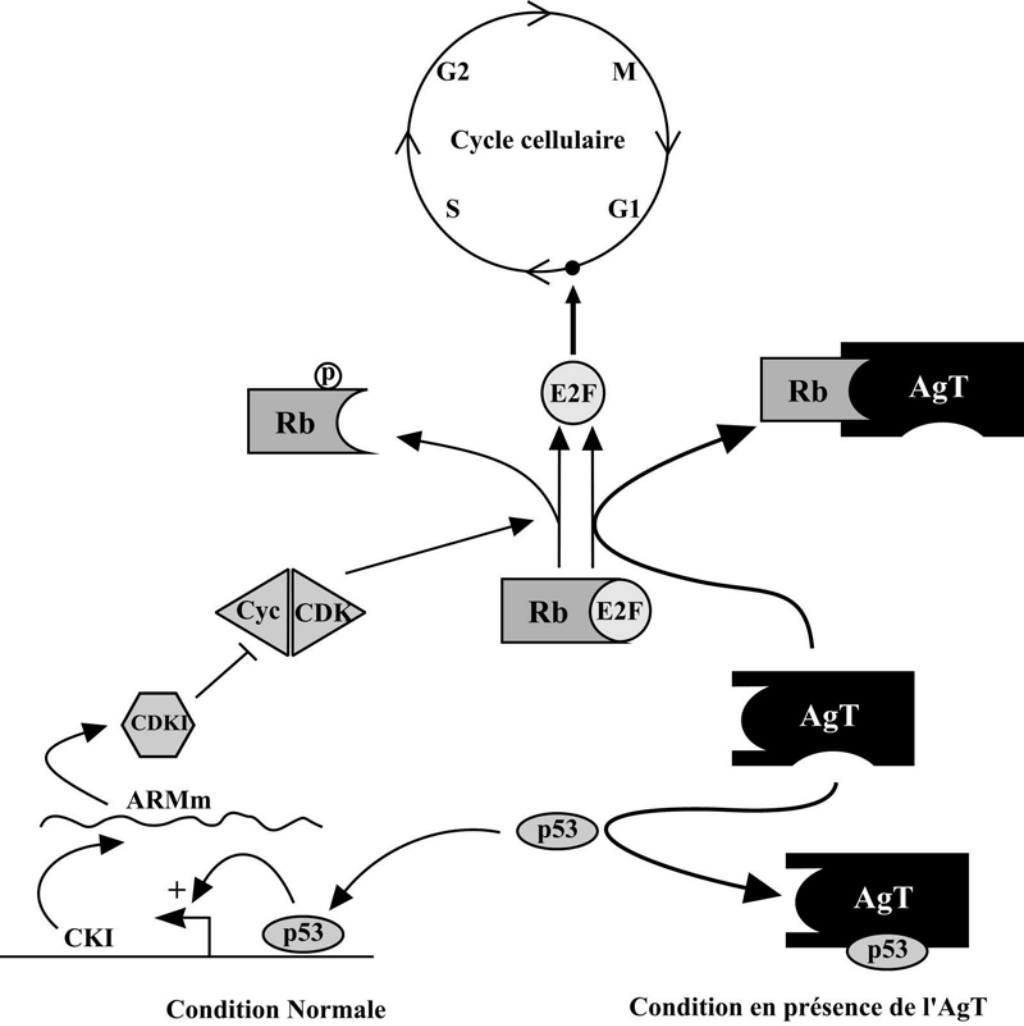


Figure 17: Interaction de l'antigène grand T de SV40 avec les protéines Rb et p53.
La progression dans la phase G1 et l'entrée en S nécessitent la libération de E2F par dissociation du complexe Rb-E2F de différentes manières:

- phosphorylation de Rb (ⓟ) par les couples cycD/CDK4,6 (tissus sains)
- interaction de l'AgT avec Rb (oncogenèse ciblée)
- mutations de Rb (cancers naturels)

La protéine E2F active la transcription de gènes impliqués dans la synthèse d'ADN et l'entrée en phase S.
La protéine p53 active la transcription d'une CKDI (p21) qui inhibe l'action des couples cycD/CDK4,6 également impliqués dans l'entrée en phase S.
La liaison de l'AgT à Rb et p53 perturbe ce point de contrôle du cycle cellulaire (point de restriction=●) et fait entrer la cellule en division.
cyc: Cyclin, CDK: Cyclin Dependent kinase, CDKI: CDK inhibitor.

A l'origine, les oncogènes ont été identifiés comme des séquences portées par des virus ayant la capacité de transformer des cellules en culture ou de provoquer des tumeurs chez l'animal infecté. Par la suite, ces séquences se sont révélées être des gènes cellulaires capturés par le génome viral. Les homologues cellulaires sont des proto-oncogènes et codent normalement pour des protéines qui assurent des fonctions souvent associées à la régulation de la prolifération. Il existe de nombreux oncogènes (*c-MYC, c-RAS, c-ERB B*…) et ils ont été classés selon la localisation et l'activité cellulaire de la protéine. Certains oncogènes viraux n'ont pourtant pas d'équivalent cellulaire, c'est le cas par exemple de l'AgT de SV40 qui possède un grand pouvoir transformant. En effet, il permet d'induire la transformation d'un large spectre cellulaire. L'Ag T est une protéine nucléaire qui a la capacité de se lier aux produits de gènes suppresseurs de tumeurs tels que Rb (gène de susceptibilité au rétinoblastome) et p53 (Figure 17). Les protéines de la famille Rb se lient normalement aux facteurs de transcription de la famille E2F pour inhiber leurs propriétés trans-activatrices et ainsi empêcher la prolifération cellulaire. La protéine p53 permet de stopper le cycle cellulaire en phase G1 pour réparer d'éventuels dommages de l'ADN et induire l'apoptose des cellules ayant une instabilité génétique. Ces séquestrations par l'AgT aboutissent à une stimulation du cycle cellulaire et favorisent l'immortalisation et la transformation des cellules conduisant, dans de nombreux cas, à l'apparition de tumeurs.

L'utilisation de séquences régulatrices d'un gène donné, spécifique d'un type cellulaire, est requise pour cibler l'expression du transgène dans un ou des tissu(s). Il existe de nombreux exemples dans lesquels l'AgT a été utilisé de la sorte, permettant ainsi d'obtenir des lignées cellulaires de différents organes ayant conservé une bonne différenciation (pour exemple : (Alarid *et al.*, 1996 ; Gordon *et al.*, 2000; Holzer *et al.*, 2003; Vandewalle, 2002)).

II.C.1. Utilisation des séquences 5' régulatrices du gène de l'inhibine α.

Les inhibines ont été définies comme étant des facteurs protéiques d'origine gonadique (granulosa et cellules de Sertoli) qui réduisent la synthèse et la sécrétion de FSH (Follicle Stimulating Hormone) hypophysaire. La transcription des gènes codant les précurseurs des sous-unités α et β inhibines est stimulée par les gonadotrophines FSH et LH (Luteinizing Hormone). Les ARNm des inhibines sont aussi retrouvés à un moindre niveau dans le cerveau, la rate, la moëlle osseuse et les surrénales.

L'utilisation d'un fragment de 6kb des régions 5' régulatrices du gène de l'inhibine α de souris, pour diriger l'expression de l'AgT, a permis d'obtenir des souris transgéniques

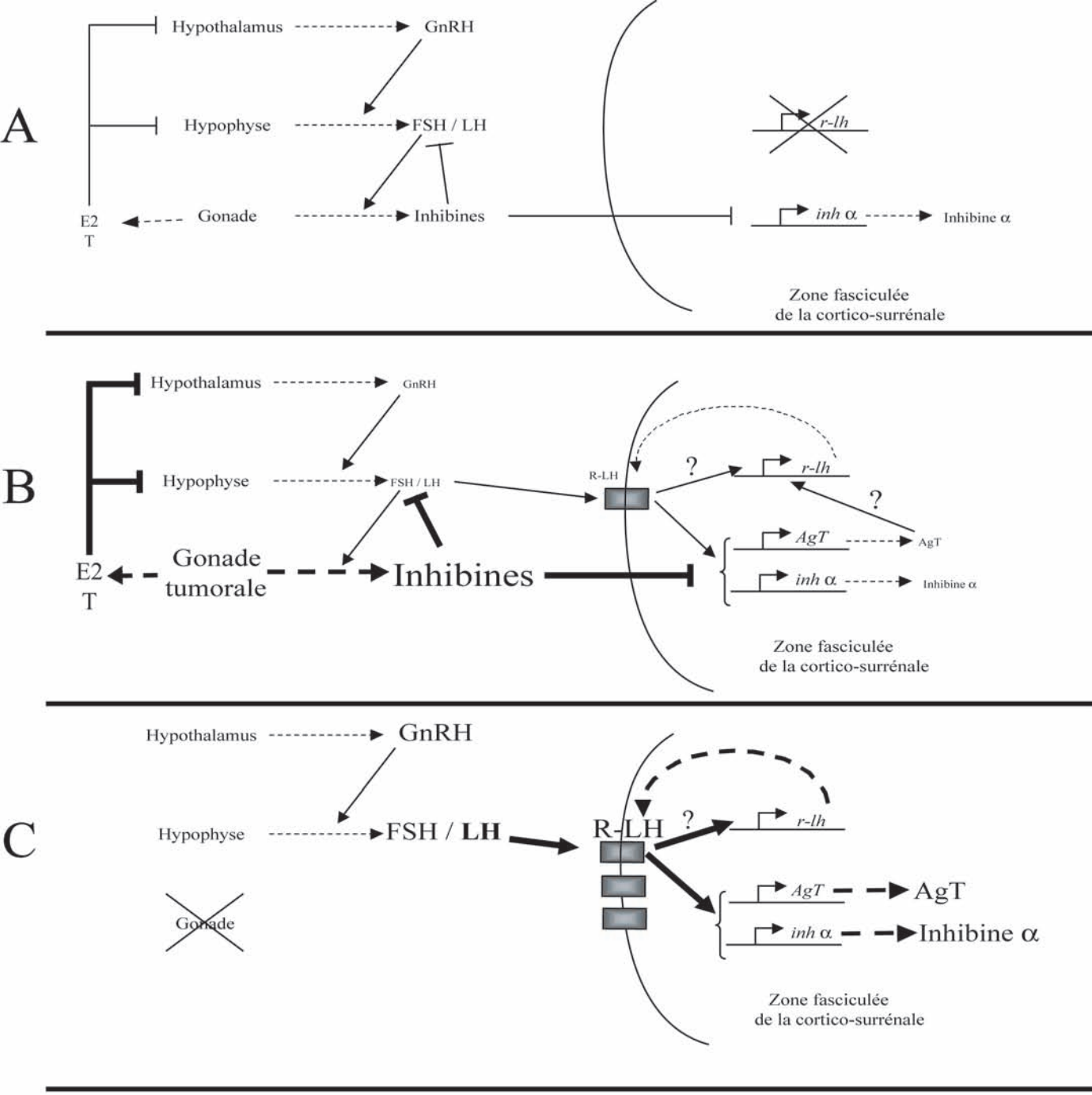


Figure 18: Mécanismes impliqués dans l'apparition de tumeurs surrénaliennes dans les souris transgéniques (inhα /AgT).

A: Souris non transgénique. Le gène codant le récepteur à LH (R-LH) ne semble pas être exprimé dans la surrénale.
B: Souris trangénique. La présence du transgène inhα/AgT dans la surrénale entraîne une faible expression de R-LH par des mécanismes inconnus (?).
C: Souris transgénique castrée. Le haut taux de LH circulante induit par la castration stimule fortement l'expression du trangène inhα/AgT dans la surrénale.

Les hormones sexuelles (E2: Oestradiol et T: Testostérone) exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique en inhibant la production de GnRH et de FSH/LH respectivement au niveau de l'hypothalanus et de l'hypophyse.

(*inhα/AgT*) développant exclusivement des tumeurs gonadiques avec une pénétrance de 100%. La croissance et la malignité de ces tumeurs sont sous l'influence des gonadotrophines (Kananen *et al.*, 1996b). Lorsque ces animaux transgéniques sont gonadectomisés, ils développent des tumeurs des surrénales qui n'apparaissent pas chez les souris non transgéniques castrées ou chez les souris transgéniques intactes (Figure 18). Lorsqu'on traite les cellules Cα1 dérivées de l'une de ces tumeurs surrénaliennes avec des inhibines, il est observé une diminution de la transcription du gène de l'inhibine α. Ces éléments suggèrent que la forte production des inhibines, par les gonades tumorales, régule négativement la transcription du gène de l'inhibine α dans la surrénale et celle du transgène AgT également sous le contrôle des mêmes régions régulatrices (Kananen *et al.*, 1996b). En fait, la castration des souris trangéniques génère des tumeurs surrénaliennes par élévation des gonadotrophines circulantes. En effet, l'implication de LH dans la genèse de ces tumeurs est fortement suggérée par le fait que chez les animaux ayant subi une castration chimique par l'antagoniste du GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), le SB-75, qui effondre le niveau des gonadotrophines, il n'apparaît pas de tumeurs surrénaliennes. De plus, en croisant ces souris avec une autre lignée de souris transgéniques ayant des taux constitutifs élevés de LH, on observe chez les femelles double transgéniques, non gonadectomisées, l'apparition de caractères histologiques tumoraux au niveau des surrénales (Mikola *et al.*, 2003).

Des analyses en northern-blot et en immunohistochimie montrent une faible mais réelle expression du récepteur à LH (R-LH) dans les surrénales des souris trangéniques inhα/AgT alors que par RT-PCR, il est impossible de détecter sa présence dans les glandes surrénales de souris sauvages intactes et gonadectomisées (Rilianawati *et al.*, 1998). La présence ou non de R-LH dans la surrénale est cependant controversée. En effet, une étude récente a montré que le récepteur LH est exprimé chez la souris au cours du développement dans les gonades, les surrénales et les reins, sous une forme immature. Puis, ensuite, chez l'adulte, la forme mature de R-LH serait retrouvée dans les gonades ainsi que dans les surrénales et les reins des femelles gestantes (Apaja *et al.*, 2005). *R-LH* serait aussi exprimé dans la zone fasciculée et réticulée de la surrénale humaine (Pabon *et al.*, 1996).

A la suite de la castration des souris transgéniques *inhα/AgT*, l'augmentation d'expression de *r-lh* observée au niveau de la surrénale est surprenante puisque, au niveau gonadique, une élévation de LH circulante entraîne une diminution de l'expression de son récepteur (Segaloff and Ascoli, 1993). Le mécanisme de régulation de l'expression de *r-lh* semble donc différer entre les gonades et ces tumeurs surrénaliennes. Le haut niveau de R-LH fonctionnel et

l'augmentation de la concentration des gonadotrophines circulantes après castration, vont fortement stimuler la transcription du gène de l'inhibine α dans les surrénales et par conséquent de l'AgT (Figure 18). Cette transcription, induite par LH et par l'absence des inhibines gonadiques, participe au déclenchement de la tumorisation surrénalienne dans ces souris transgéniques (Rilianawati *et al.*, 1998).

Les cellules Cα1 dérivées d'une de ces tumeurs surrénaliennes voient leur production de progestérone stimulée à la suite d'un traitement par l'hCG (human Chorionic Gonadotropin), un agoniste de LH (Rilianawati *et al.*, 1998). Cependant, les tumeurs, dont l'une d'elles a été utilisée pour dériver la lignée cellulaire Cα1, ont une production accrue de progestérone et d'œstradiol alors que la production de corticostérone (stéroïde surrénalien majeur) est clairement réduite (Kananen *et al.*, 1996b). Ces tumeurs présentent donc une dérégulation de la stéroïdogenèse qui s'explique par l'origine embryonnaire commune des gonades et du cortex surrénalien. Aucune donnée n'est disponible sur les effets de l'ACTH et de l'ANGII sur ces cellules.

II.C.2. Utilisation des séquences 5' régulatrices du gène *CYP11A1*.

Dans des souris transgéniques, 2,3kb de séquences 5' régulatrices du gène *CYP11A1* humain sont suffisantes pour cibler l'expression du gène rapporteur *LacZ* dans les surrénales et les gonades de souris. L'ACTH induit l'expression du transgène 2,3kb*hCYP11A1*/*LacZ* de la même façon que le gène *cyp11a1* endogène (Hu *et al.*, 1999). Ces séquences régulatrices ont été utilisées pour contrôler l'expression de l'AgT dans les surrénales. Trois lignées cellulaires issues de trois tumeurs surrénaliennes différentes (ST2, ST5-R et ST5-L), prélevées sur deux femelles, ont été dérivées (Mellon *et al.*, 1994). Il a été mis en évidence, à la fois par northern-blot et par la technique de protection à la RNAse, que dans ces cellules, l'expression de l'ARNm *cyp11a1* était augmentée après stimulation à l'AMPc. Ces cellules ne semblent pas exprimer le récepteur à l'ACTH car aucune stimulation en présence d'ACTH n'est observée. Ces trois lignées cellulaires produisent en abondance de la progestérone comme le montre l'analyse par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) des milieux de culture. Les précurseurs tels que la pregnénolone ne sont pas détectés, ce qui signifie que ces cellules ont conservé une forte activité 3βHSD. L'HPLC révèle pour une des trois lignées cellulaires (ST5-L) une production faible de désoxycorticostérone mais pas de corticostérone. Cependant, les ARNm *cyp21a1* sont indétectables dans cette lignée cellulaire

suggérant qu'une autre enzyme est responsable de la formation de désoxycorticostérone. Les ARNm *cyp11b1* sont détectables par RT-PCR alors que ceux du gène *cyp11b2* ne le sont pas.

La lignée cellulaire ST5-L a été sous clonée par le principe de dilution limite (Compagnone *et al.*, 1997), et 24 clones différents, notés de ST5-Lc1 à c24, ont été obtenus. A la différence des cellules ST5-L d'origine, le dosage radio-immunologique de la corticostérone dans les milieux de culture des différents clones ST5-Lc a montré qu'ils produisaient de la corticostérone (< 10µg/µg d'ADN/ 24h). Les clones ST5-Lc4 et ST5Lc16, présentent une forte augmentation de cette production en réponse à l'AMPc, respectivement de 11 fois et de 18 fois. Cependant, de façon surprenante, dans ces deux clones, l'expression de *cyp11a1* n'est pas augmentée par l'AMPc. De plus, ces deux clones n'expriment pas *mc2r* ce qui les rend insensibles à l'ACTH. Enfin, le clone ST5-Lc16 exprime également le gène *cyp11b2* lui permettant de produire de l'aldostérone.

Etant donné qu'*in vivo* le gène *cyp11b1* n'est exprimé que dans la zone fasciculée, ces différentes lignées cellulaires ont un profil d'expression enzymatique proche des cellules constituant cette partie du cortex, à l'exception du sous-clone ST5-Lc16 qui exprime également *cyp11b2*, marqueur de la zone glomérulée. Toutefois, ces modèles cellulaires de la zone fasciculée présentent des limites dont les principales sont l'absence d'expression du gène *cyp21a1* et leur insensibilité à l'ACTH.

II.C.3. Utilisation d'un AgT thermosensible

Ici il ne s'agit pas à proprement parler d'oncogenèse ciblée mais simplement de transgenèse additive. En effet, Mukai *et al.* ont utilisé un AgT thermosensible sous le contrôle de ses propres séquences régulatrices et introduit chez la souris par transgenèse (Yanai *et al.*, 1991). Cet AgT a la particularité d'être sensible à la température (AgT-tsA58), à 33°C il est actif alors qu'il devient inerte à 39°C. L'utilisation d'un tel oncogène permet de déclencher l'immortalisation des cultures primaires de cellules de différents organes, en les plaçant à une température permissive (33°C). De plus, une fois les cellules immortalisées, l'AgT peut être inactivé afin de minimiser ses effets sur la physiologie cellulaire en plaçant les cultures à 39°C.

Par cette technique, ces auteurs ont mis en culture des cellules cortico-surrénaliennes (Mukai *et al.*, 2002). Les analyses histologiques préalables sur les animaux transgéniques ne montrent pas de défaut de structure des surrénales ou de la zonation de l'expression des marqueurs *cyp11b1* (zone fasciculée) et *cyp11b2* (zone glomérulée), indiquant l'absence

d'effets notables de l'AgT-tsA58 sur la surrénale *in vivo*. Trois lignées ont été obtenues (AcA201, AcA101 et AcE60). La lignée AcA201 exprime les gènes *cyp11a1*, *star*, *cyp11b1* et *sf-1*. Les lignées AcA101 et AcE60 expriment sensiblement les mêmes gènes à l'exception de *cyp11b1*, mais elles se mettent à l'exprimer une fois placées à 39°. Les ARNm *cyp11b2*, présents normalement dans la zone glomérulée, ne sont pas détectés dans les trois lignées quelles que soient les conditions de culture. Ces données suggèrent que ces lignées présentent un phénotype de cellules de la zone fasciculée (AcA201) ou qu'elles ont la capacité de l'acquérir (AcA101 et AcE60). Les trois lignées cellulaires sont insensibles à l'ACTH et à l'ANGII traduisant un défaut d'expression de leurs récepteurs respectifs. Les effets du Bt2AMPc, activateur de la voie PKA, sur l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse et sur la production de stéroïde ont été analysés pour les trois lignées. Certains des gènes comme *cyp11a1* et *star* ont conservé une sensibilité à la voie de l'AMPc. L'expression des gènes *cyp21a1* et *3ßhsd* n'est pratiquement pas détectable à 33°C avec ou sans Bt2AMPc, mais est rendue possible pour certaines des lignées en les plaçant à 39°C en présence de Bt2AMPc. Les analyses HPLC sur les milieux de cultures des différents clones montrent que ces cellules produisent essentiellement de la progestérone et de faibles quantités de désoxycorticostérone. La production de progestérone est fortement augmentée après un traitement Bt2AMPc.

En conclusion, ces différentes lignées expriment *cyp11b1* ou se mettent à l'exprimer lorsque l'AgT devient inactif (à 39°) et elles n'expriment pas *cyp11b2*, ce qui laisse supposer qu'elles proviennent soit de précurseurs, soit de cellules de la zone fasciculée. Cependant, ces cellules présentent d'importants défauts au niveau de l'expression des acteurs de la stéroïdogenèse ainsi qu'au niveau de la production des stéroïdes et elles sont complètement insensibles à l'ACTH. De plus, lorsque ces cellules sont placées à une température non permissive pour l'AgT (39°), afin de l'inactiver, elles cessent de proliférer et finissent, après quelques jours, par se décoller du support sur lequel elles sont cultivées. Ces cellules ne représentent donc pas un très bon modèle d'étude.

III. Les tumeurs de la cortico-surrénale

Les tumeurs malignes primitives de la surrénale (cortico-surrénalomes) sont rares (2 cas par an et par million d'habitants), moins fréquentes que celles issues de métastases (Luton *et al.*, 1990), alors que les adénomes cortico-surrénaliens qui, le plus souvent, ne produisent pas

d'hormones en excès, font partie des tumeurs les plus fréquentes, plus de 7% chez les sujets de plus de 50 ans (Kloos *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 2000). Le plus souvent, la découverte des masses cortico-surrénaliennes bénignes se fait fortuitement à l'occasion de divers examens médicaux, on parle alors d'incidentalomes.

Les cortico-surrénalomes produisent le plus souvent des hormones et peuvent alors être responsables d'un syndrome de Cushing (§ III.B.1.) qui traduit la sécrétion excessive de glucocorticoïdes.

III.A. Les différentes lésions cortico-surrénaliennes

III.A.1. Les lésions bénignes de la cortico-surrénale.

III.A.1.a. L'adénome cortico-surrénalien

Dans sa forme typique, l'adénome est une lésion unique, de quelques millimètres à quelques centimètres. Les adénomes non fonctionnels sont de loin les plus fréquents. Les adénomes fonctionnels peuvent être à l'origine d'un syndrome de Conn, avec sécrétion inappropriée d'aldostérone par le cortex surrénalien (hyperaldostéronisme primitif), ou d'un syndrome de Cushing par sécrétion autonome surrénalienne de cortisol (ces syndromes sont décrits plus loin, § III.B.). En cas d'adénome fonctionnel, la glande controlatérale peut être normale ou atrophique.

III.A.1.b. Les hyperplasies cortico-surrénaliennes

Les hyperplasies peuvent se présenter sous plusieurs aspects :

- hyperplasies diffuses, associées au syndrome de Cushing ACTH-dépendant ou au syndrome adréno-génital (déficits enzymatiques surrénaliens). Ces hyperplasies se caractérisent par une augmentation globale, harmonieuse et souvent bilatérale.
- hyperplasies micro ou macronodulaires :
  - Les hyperplasies micronodulaires pigmentées du cortex surrénalien (primary pigmented nodular adrenocortical disease ou PPNAD). Dans ce cas, les surrénales ont un aspect particulier, présentant de nombreux petits nodules foncés. Ce sont des tumeurs endocrines bénignes dont la morbidité élevée est associée à un syndrome de Cushing isolé ou observé dans le cadre d'un syndrome multi-néoplasique, appelé

complexe de Carney. (Le complexe de Carney est décrit au § III.C.5. et les aspects concernant les PPNAD sont repris en détail plus loin, § III.E.2.)

- Les hyperplasies macronodulaires bilatérales indépendantes de l'ACTH (ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia ou AIMAH) sont des lésions bénignes (nodules >0,5cm), associées à des syndromes de Cushing indépendants de l'ACTH.

III.A.2. Les lésions malignes de la cortico-surrénale.

Le cortico-surrénalome est habituellement une tumeur volumineuse. Le syndrome de Cushing ou le syndrome de virilisation en sont les manifestations endocriniennes les plus fréquentes (§ III.B.). C'est une tumeur rare, 2 cas par an et par million d'habitants (Luton *et al.*, 1990). Elle survient le plus souvent entre 40 et 50 ans. Elle présente aussi un pic d'incidence chez l'enfant. Elle représente 6 % des tumeurs surrénaliennes de l'enfant. C'est une tumeur grave, extrêmement agressive puisque 80% des patients développent des métastases (Gicquel *et al.*, 1997a) et la survie à 5 ans est exceptionnelle (Luton *et al.*, 1990). Il existe une prédominance de ces tumeurs chez la femme. Les cortico-surrénalomes peuvent être sécrétants ou non sécrétants. Les symptômes cliniques varient en fonction de l'hormone produite en excès (voir § III.B.). L'incidence des cortico-surrénalomes augmente chez les patients atteints de syndromes de prédispositions à des tumeurs tels que le syndrome de Beckwith-Wiedemann et le syndrome de Li-Fraumeni (décrits au § III.C.).

III.B. Les syndromes dus aux hypersécrétions en cas d'atteintes cortico-surrénaliennes.

L'ensemble des troubles dus à la sécrétion excessive d'une ou de plusieurs des principales hormones cortico-surrénaliennes est appelé hypercorticisme. On distingue classiquement : l'hypercorticisme glucocorticostéroïde (ou hypercortisolisme), l'hypercorticisme minéralocorticoïde (ou hyperaldostéronisme), l'hyperandrogénie surrénalienne (ou hyperandrogénisme) et l'hyperoestrogénie.

Les tumeurs cortico-surrénaliennes bénignes ou malignes peuvent se révéler par trois grands syndromes endocriniens : le syndrome de Cushing, le syndrome de Conn et le syndrome adréno-génital.

III.B.1. Le syndrome de Cushing

Le syndrome de Cushing correspond à l'hypersécrétion par les glandes surrénales de cortisol (hypercortisolisme). Cette hypersécrétion de cortisol peut être :

- soit indépendante des taux d'ACTH, c'est le cas lorsque l'anomalie primitive est surrénalienne (15 à 30% des syndromes de Cushing). Dans ce cas, les taux d'ACTH circulants sont effondrés par rétrocontrôle négatif sur la sécrétion d'ACTH dû à l'augmentation du cortisol circulant (Figure 6).
- soit dépendante de l'ACTH. Ici les surrénales sont stimulées par une sécrétion excessive d'ACTH relevant d'adénomes hypophysaires sécrétant de l'ACTH (maladie de Cushing) ou due à une tumeur maligne sécrétrice d'ACTH dans un autre organe (bronches, pancréas…). On parle alors de syndrome de Cushing paranéoplasique. Exceptionnellement c'est une sécrétion ectopique de CRH qui est à l'origine du syndrome de Cushing paranéoplasique.

III.B.2. Le syndrome de Conn

Le syndrome de Conn ou hyperaldostéronisme primaire, décrit en 1955 par Conn, est généralement dû au développement d'une tumeur cortico-surrénalienne bénigne, exceptionnellement maligne, qui se traduit par une sécrétion accrue d'aldostérone conduisant à une hypertension artérielle avec hypokaliémie.

III.B.3. Le syndrome adréno-génital

Le syndrome adréno-génital dû à une hyperplasie congénitale des surrénales avec virilisation est une pathologie transmise selon le mode autosomique récessif et causée par un défaut enzymatique dans la production du cortisol. Plus de 80% des cas sont dus à un défaut de la 21-hydroxylase (P450c21 ou CYP21A2), les cas restants sont essentiellement dus à un déficit de la 11β-hydroxylase (P450c11β ou CYP11B1) et de la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3βHSD ou 3βHSD II) (Figure 4). En raison de la production inadéquate de cortisol, le feed-back négatif (Figure 6) sur l'hypophyse ne sera pas exercé et l'ACTH sera produit par l'hypophyse en quantité excessive entraînant une hyperplasie des cellules surrénaliennes sensibles à l'ACTH. Les manifestations cliniques dépendront des déficits hormonaux et des propriétés biologiques des hormones intermédiaires produites en quantités anormalement élevées. Le plus souvent, on observera une virilisation.

Syndrome	Autres tumeurs	Autres anomalies	Gènes (Locus)
Syndrome de Wermer Néoplasies endocriniennes multiples de type I (OMIM 131100)	Adénomes des parathyroïdes Insulinomes, glucagonomes, gastrinomes Adénomes hypophysaires Tumeurs neuroendocrines (carcinoïdes) diffuses bronchiques ou digestives Schwannomes		***MEN 1*** **(11q13)**
Syndrome de Li-Fraumeni (OMIM 151623)	Sarcomes des tissus mous Leucémies Adénocarcinomes du sein et pulmonaires Tumeurs cérébrales Tumeurs testiculaires Carcinomes du pancréas		***TP53*** **(17p13)** ***hCHK2*** **(22q12.1)**
Syndrome de Gardner Les polyposes coliques familiales (OMIM 175100)	Polypose et cancer du colon Carcinomes biliaires et ampullomes Carcinomes thyroïdiens Hépathoblastomes Ostéosarcomes	Kystes sébacés Ostéomes Hypertrophie rétinienne	***APC*** **(5q21-22)**
Syndrome de Wiedemann Beckwith (OMIM 130650)	Néphroblastomes Gonadoblasmes Neuroblastomes Glioblastomes Hépatoblastomes Pancréatoblastomes Rhabdomyosarcome	Omphalocèle Macroglossie Gigantisme néonatal Viscéromégalie Hypertrophie-hémicorporelle	***$p57^{KIP2}$, IGF2, H19, LIT1…*** **(11p15)**
Syndrome de Carney (OMIM 605244)	Myxome cardiaque paragangliomes Tumeurs pituitaires thyroïdiennes Tumeurs des cellules de Sertoli Schwannomes Leïomyomes Lentiginose cutanée		***PRKAR1A*** **(17q23-24)** **?** **(2p16)**

Tableau 4: Syndromes tumoraux héréditaires et tumeurs de la surrénale (Cussenot and Fournier 2000).
Ne sont indiquées que les tumeurs et les anomalies autres que celles retrouvées au niveau de la cortico-surrénale.

III.C. Les formes familiales des tumeurs cortico-surrénaliennes.

Certains syndromes familiaux prédisposent à l'apparition de tumeurs dans divers tissus, dont la cortico-surrénale. C'est le cas des syndromes de Wermer, de Li-Fraumeni, de Gardner, de Beckwith-Wiedemann et de Carney (tableau 4).

III.C.1. Le syndrome de Wermer (OMIM 131100)

Le syndrome de Wermer ou Néoplasies Endocriniennes Multiple de type 1 (NEM 1) est associé à des mutations inactivatrices du gène *MEN1* qui code la ménine (11q13), qui serait un suppresseur de tumeur. Ce gène, cloné en 1997, code pour la protéine ménine dont la fonction reste inconnue à ce jour. La ménine interagit avec de nombreux partenaires protéiques. Cependant, la signification biologique et le rôle fonctionnel de ces interactions dans les cellules endocrines, en général, restent à élucider (Agarwal *et al.*, 2004; Marx, 2005).

Les atteintes principales dans les NEM1 sont des tumeurs des glandes parathyroïdes, du pancréas, de l'antéhypophyse, de l'intestin et du cortex surrénalien. Un pourcentage non négligeable de ces tumeurs présente une évolution maligne.

Pour évaluer le rôle de la ménine dans la tumorigenèse, l'invalidation chez la souris de son gène *men1* a été effectuée (Crabtree *et al.*, 2001). Les souris homozygotes pour l'invalidation meurent *in utero* entre E11.5 et E12.5. Les souris hétérozygotes, *men1+/-*, sont viables et présentent des phénotypes proches de ce qui est rencontré chez les patients. Dès 9 mois, le pancréas de ces souris présente une hyperplasie et des adénomes parathyroïdiens sont fréquemment observés. De plus, à partir de 16 mois, de nombreux autres tissus présentent des tumeurs, dont le cortex surrénalien. Toutes les tumeurs examinées présentent une perte de l'allèle sauvage, confirmant le rôle de suppresseur de tumeur pour le gène *men1*. Cependant, l'invalidation ciblée du gène *men1* dans le foie (Scacheri *et al.*, 2004), tissu qui n'est normalement pas prédisposé à développer des tumeurs chez les patients atteints du syndrome de Wermer ou chez les souris hétérozygotes *men1+/-*, en utilisant la stratégie Cre/LoxP, a permis de montrer que cet organe est en quelque sorte insensible à la perte de l'expression du gène *men1*. En effet, ces souris ne présentent aucun défaut au niveau du foie, démontrant ainsi la spécificité tissulaire du rôle suppresseur de tumeur de ce gène.

III.C.2. Le syndrome de Li-Fraumeni (OMIM 151623)

Le syndrome de Li-Fraumeni (sarcomes familiaux) de transmission autosomique dominante est une affection rare du sujet jeune qui consiste à une prédisposition à diverses tumeurs. La définition historique (Li and Fraumeni, 1969) et classique est basée sur des critères familiaux, elle repose essentiellement sur l'observation d'un sarcome chez un sujet atteint de moins de 45 ans apparenté au premier degré à une personne ayant eu un cancer de n'importe quel type avant 45 ans. Les tumeurs les plus caractéristiques sont les ostéosarcomes, les sarcomes des tissus mous, les cancers du sein du sujet jeune, les leucémies, les tumeurs cérébrales et les cortico-surrénalomes. Une mutation germinale du gène *TP53* (17p13), suppresseur de tumeur, localisé sur le chromosome 17 et codant pour la protéine p53, est retrouvée dans environ 70% des cas familiaux de ce syndrome. Une mutation germinale du gène *hCHK2* (22q12), codant une kinase régulant le cycle cellulaire, a été également décrite dans de rares familles. Le risque de développer un cancer pour un sujet porteur d'une mutation délétère du gène *TP53* est de 15% à 15 ans, de 80% pour les femmes à 50 ans et de 40% pour les hommes au même âge; la différence entre les sexes étant presque totalement expliquée par le cancer du sein.

III.C.3. Le syndrome de Gardner (OMIM 175100)

Le syndrome de Gardner ou polypose adénomateuse familiale (PAF) est une maladie autosomique dominante qui prédispose aux cancers colorectaux chez l’adulte. Ce syndrome est rare, environ une personne sur 14000. Elle est responsable de 1% des cancers colorectaux. Des tumeurs sont également observées dans d’autres sites anatomiques incluant des cortico-surrénalomes, des tumeurs de la thyroïde, du cerveau ou de la partie haute du tube digestif (estomac et intestin grêle). Certains signes cliniques participent au diagnostic comme l’hypertrophie congénitale de la couche pigmentaire de la rétine ou des kystes sébacés. Les mutations qui prédisposent à la maladie touchent le gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) (5q21-22). La fonction de la protéine APC au sein de la cellule est de contrôler le taux intracellulaire de ß-caténine afin qu’elle ne puisse pas exercer son pouvoir oncogène. En effet, cette dernière possède un rôle co-activateur de la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Des adénomes et des cortico-surrénalomes malins ont été décrits dans les manifestations extracoliques de ce syndrome (Painter and Jagelman, 1985).

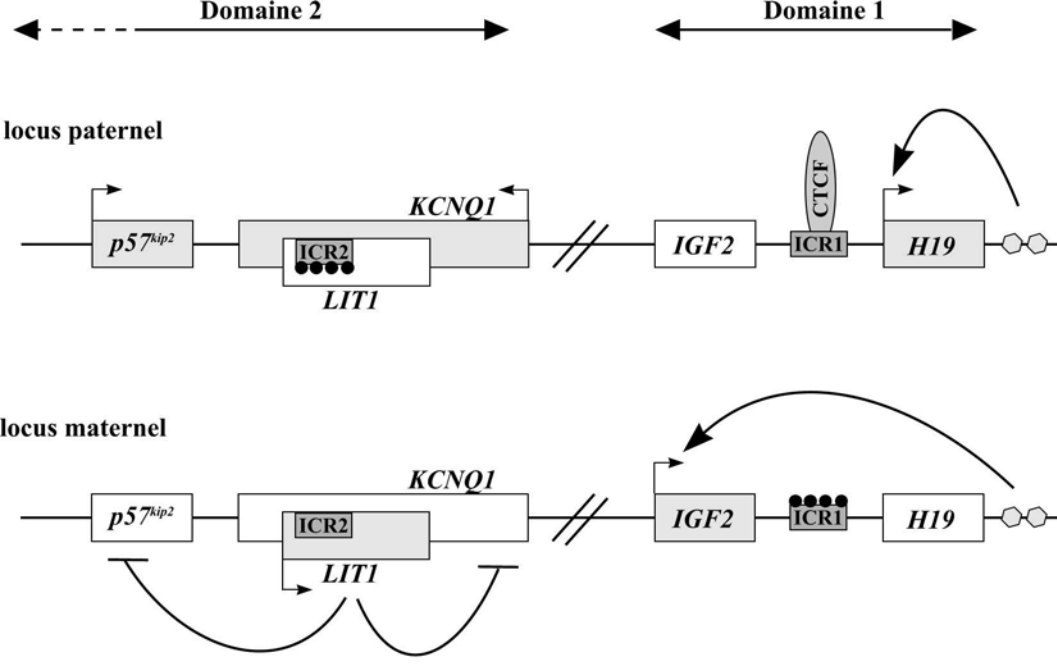


Figure 19: Organisation de la région 11p15.5
La région 11p15.5 est soumise à empreinte parentale et est organisée en deux domaines contrôlés par des centres d'empreintes (ICR). Cette régulation est décrite dans le texte.

noms équivalents pour certaines des régions représentées:
p57kip2 = CNKN1C
LIT1 = KCNQ10T1 = KvLQT1-AS
ICR1 = DMR1 = H19DMR
ICR2 = DMR2 = KvDMR1

gène transcrit

gène non transcrit

site d'initiation de la transcription

● = méthylation

⬡ = enhancers

activation

répression

III.C.4. Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (OMIM 130650)

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) est un syndrome de croissance excessive (macrosomie) associant une macroglossie, une viscéromégalie, une cytomégalie cortico-surrénalienne, une dysplasie rénale et un hyperinsulinisme néonatal transitoire et des anomalies de développement, au premier rang desquelles des anomalies de fermeture de paroi et plus particulièrement de la paroi abdominale (omphalocèle). Son incidence est de l'ordre de 1 nouveau cas pour 13700 naissances. Le SBW constitue un syndrome de prédisposition aux tumeurs, 5 % des patients atteints de SBW développent une tumeur embryonnaire: néphroblastome (ou tumeur de Wilms), corticosurrénalome, hépatoblastome, rhabdomyosarcome embryonnaire. Une liaison des SBW familiaux avec la région 11p15.5 a été mise en évidence (Koufos *et al.*, 1989; Ping *et al.*, 1989). Une des particularités de la région 11p15.5 est d'être soumise à empreinte parentale. C'est-à-dire qu'un seul des deux allèles de certains gènes de cette région s'exprime selon son origine parentale.

La région 11p15.5 est organisée en 2 domaines (Figure 19) :

- le domaine 1, du coté télomérique, incluant les gènes *H19* et *IGF2* (Insulin-like Growth Factor 2). Ce dernier code un facteur de croissance jouant un rôle déterminant dans la croissance embryonnaire. Le gène H19 code un ARN non traduit.
- le domaine 2, du coté centromérique, contenant les gènes $p57^{kip2}$ (ou *CDKN1C*, Cyclin dependent kinase inhibitor 1c) qui code un inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines (CDKIs) contrôlant la transition G1/S, *KCNQ1* (potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1) et *LIT1* (ou *KCNQ10T1*, KCNQ1-overlapping transcript 1; ou encore *KvLQT1-AS*) qui code un ARN antisens de l'intron 10 du gène *KCNQ1*.

Chaque domaine est contrôlé par son propre centre d'empreinte (ICR : Imprinting Control Region) : ICR1 pour le domaine 1, appelé aussi DMR1 (Differentially Methylated Region 1) ou H19DMR. ICR2 pour le domaine 2, aussi appelé DMR2 ou KvDMR1 (Reik and Walter, 2001).

Au niveau du domaine 1 du locus paternel, ICR1 n'est pas méthylé et fixe les protéines CTCF (CCCTC binding factor), jouant le rôle d'insulateurs, empêchant alors des enhancers de venir activer la transcription du gène *IGF2*. Dans ces conditions, *H19* est exprimé. Sur le locus maternel, la méthylation de la région ICR1 empêche la fixation des protéines CTCF levant la barrière qu'elles exerçaient.

Au niveau du domaine 2, c'est la transcription du gène *LIT1* qui va conditionner la répression des autres gènes avoisinants. ICR2 est méthylé sur le locus paternel ce qui conduit à la répression du gène *LIT1* et permet celle du gène *KCNQ1* par des mécanismes qui ne sont pas encore complètement élucidés. Le gène $p57^{kip2}$ peut alors, dans ces conditions, être exprimé (Cleary *et al.*, 2001; Fitzpatrick *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1999; Smilinich *et al.*, 1999). Il est important de retenir pour la suite qu'*IGF2* n'est exprimé que par l'allèle paternel alors que c'est l'allèle maternel qui exprime $p57^{kip2}$ (Figure 19).

Les différentes anomalies génétiques retrouvées dans le SBW.

Les analyses caryotypiques d'enfants porteurs d'un Syndrome de Beckwith-Wiedeman sporadique ont montré la présence de duplications de la région 11p15.5, toujours d'origine paternelle sans perte du locus maternel (trisomie avec duplication paternelle). Dans d'autres cas, le caryotype est normal mais l'étude de marqueurs de polymorphisme montre la présence d'un doublement des allèles d'origine paternel et une disparition des allèles d'origine maternelle. Cette situation est appelée "unidisomie uniparentale paternelle". Ces anomalies conduisent à une sur-expression d'*IGF2*.

Des mutations dans le gène $p57^{kip2}$ sont trouvées dans environ 5% des patients atteints de SBW sporadique (Lam *et al.*, 1999). Les patients présentant des mutations du gène $p57^{kip2}$ ont un phénotype typique du SBW, avec une forte fréquence d'omphalocèle. Les mutations dans le gène $p57^{kip2}$ sont beaucoup plus fréquentes dans les SBW familiaux (environ 50%).

Des anomalies épigénétiques sont décrites pour cette région :

- Une hyperméthylation du gène *H19* est retrouvée dans 10% des cas de SBW.
- Une déméthylation de KvDMR1 (ICR1) est présente chez 55 à 60% des patients.
- Il a été montré récemment que des microdélétions dans ICR1 (H19DMR) (Sparago *et al.*, 2004) ou dans ICR2 (Niemitz *et al.*, 2004) permettent d'expliquer certains cas de SBW qui associent une hyperméthylation de *H19* ou une déméthylation de *KCNQ10T1*.

Comme nous venons de le voir, le SBW est un désordre multigénique lié à des défauts de régulation de gènes soumis à empreinte parentale dans le locus 11p15.5 (Bliek *et al.*, 2001; DeBaun *et al.*, 2002; Engel *et al.*, 2000), qui conduit, entre autre, à une sur-expression du gène *IGF2* (expression de 2 allèles au lieu d'un seul) et à une diminution ou une extinction d'expression de $p57^{kip2}$.

Des modèles animaux ont été créés afin de démontrer expérimentalement la responsabilité d'IGF2 et/ou de $p57^{KIP2}$ dans le déclenchement du SBW. Ces modèles animaux, l'implication d'*IGF2* et de $p57^{kip2}$ dans ce syndrome et d'une façon plus particulière dans l'apparition de cortico-surrénalomes sporadiques seront abordés au § III.E.1..

III.C.5. Le syndrome de Carney (OMIM 160980)

Le syndrome ou le complexe de Carney (CNC) décrit par Carney en 1985 est caractérisé par des lésions pigmentées de la peau, des myxomes, des tumeurs endocrines et des schwannomes.

- Les lésions pigmentées de la peau : Les lengitinoses cutanées sont les manifestations cliniques les plus courantes et elles augmentent avec la puberté. D'autres anomalies peuvent se développer, des naevus bleus, des taches café-au-lait, des dépigmentations…
- Les myxomes : Les myxomes cardiaques se manifestent très tôt chez les patients et peuvent conduire à des arrêts cardiaques. La peau, les seins et d'autres organes peuvent aussi être le siège de myxomes.
- Les tumeurs endocrines : L'hyperplasie micronodulaire pigmentée du cortex surrénalien (PPNAD: Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease) responsable du syndrome de Cushing associé, est une des tumeurs endocrines les plus fréquentes observées dans le complexe de Carney. En effet, elles sont retrouvées chez environ 25% des patients. Des tumeurs des cellules de Sertoli (LCCSCT : Large-Cell Calcifying Sertoli Cell Tumors) et des adénomes folliculaires de la thyroïde sont aussi très fréquemment retrouvés. La production excessive d'hormone de croissance par un adénome des cellules somatotropes de l'antéhypophyse est responsable d'une acromégalie évidente chez 10% des patients adultes
- Le schwannome mélanotique psammomateux, qui est une tumeur très rare des gaines nerveuses développée aux dépens des cellules de Schwann qui entourent les nerfs, se produit chez 10% des patients.

Le CNC est un syndrome héréditaire autosomal dominant. Environ 70% des patients diagnostiqués ont un des parents atteints et seulement 30% des cas de CNC sont des mutations somatiques *de novo*. Deux loci ont été associés à ce syndrome : 2p16 et 17q22-24. Au niveau du locus 2p16, le gène associé au CNC reste inconnu jusqu'à ce jour. Des mutations

Stades	Extension	Taille de la tumeur
I	Tumeur localisée dans la glande	= 5 cm
II	Tumeur localisée dans la glande	> 5 cm
III	Invasion locale ou de proximité sans métastases	Toutes tailles
IV	Métastases à distance ou invasion dans les organes adjacents	Toutes tailles

Tableau 5: Classification de McFarlane des carcinomes du cortex surrénalien basée sur la taille et l'extension de la tumeur

Critères	Scores (somme algébrique des critères de malignité identifiés)	Interprétation
1. Grade nucléaire (positif pour les grades III et IV) 2. Index mitotique (positif lors du dénombrement de plus de 5 mitoses pour 50 champs à fort grossissement : diamètre 0,47 mm) 3. Présence de mitoses atypiques 4. Présence de moins de 25% de cellules au cytoplasme clair 5. Architecture caractéristique tumorale diffuse 6. Nécrose 7. Envahissement veineux 8. Envahissement des sinusoïdes 9. Effraction capsulaire	0	Tumeur bénigne
	1-3	Tumeur suspecte
	4-9	Tumeur maligne

Tableau 6: Critères histologiques pronostiques de Weiss (d'après Weiss et al, 1984)

inactivatrices dans le gène *PRKAR1A*, codant pour une sous-unité régulatrice de la PKA (RIa) et situé dans le locus 17q22-24, sont responsables d'environ 50% des cas de CNC. Les mutations du gène *PRKAR1A* peuvent aussi se rencontrer dans des PPNAD isolées.

Les patients atteints d'un PPNAD ont des taux d'ACTH très faibles et peuvent présenter une réponse paradoxale à la dexaméthasone (Stratakis *et al.*, 1999). C'est-à-dire qu'en réponse à un traitement par la dexaméthasone, on observe une augmentation du cortisol plasmatique au lieu d'une diminution normalement induite par l'inhibition de la synthèse d'ACTH au niveau hypophysaire. Il a été mis en évidence que cette réponse paradoxale pouvait être la conséquence de l'expression du récepteur GR (Glucocorticoid Receptor), au niveau des nodules PPNAD du cortex surrénalien, qui stimulerait la stéroidogenèse (Bourdeau *et al.*, 2003).

L'implication du gène *PRKAR1A* dans le complexe de Carney et en particulier dans les PPNAD associés ou sporadiques, ainsi que la présentation des modèles animaux qui ont été générés pour reproduire les anomalies d'expression de ce gène sont décrites dans la dernière partie de cette introduction bibliographique, § III.E.2..

III.D. Les problèmes de diagnostic liés aux tumeurs cortico-surrénaliennes.

Les tumeurs cortico-surrénaliennes sont divisées, comme nous venons de le voir, en formes bénignes et en formes malignes. Ces dernières, les carcinomes, sont rares mais extrêmement agressives puisque 80% des patients développent des métastases (Gicquel *et al.*, 1997a) et d'un très mauvais pronostic avec seulement 20% de survie à 5 ans (Luton *et al.*, 1990).

La classification des tumeurs cortico-surénaliennes se fonde sur plusieurs critères, la taille de la tumeur, son degré d'invasion et sur les examens histopathologiques. Selon la classification de McFarlan (Macfarlane, 1958) (tableau 5), les tumeurs présentant une invasion ou des métastases sont classées dans la catégorie des tumeurs malignes (stade III et IV). Pour les tumeurs localisées, le diagnostic est basé sur l'analyse histopathologique en utilisant les critères de Weiss (Weiss, 1984) (tableau 6). Cependant, dans environ 30% des cas où le score de Weiss est compris entre 1 et 3, les analyses histopathologiques laissent planer un doute sur le caractère bénin de la tumeur (Gicquel *et al.*, 2001).

La cancérogénèse des tumeurs de la cortico-surrénale est méconnue et la distinction morphologique macro et microscopique entre adénome et cortico-surrénalome est parfois très difficile. Certaines données tendent à montrer que le développement tumoral serait semblable à celui observé pour d'autres organes, où les modifications génétiques augmenteraient avec le caractère malin, comme c'est le cas pour le cancer du colon (Gryfe *et al.*, 1997). Cependant, certains arguments sont en défaveur de ce schéma progressif du développement tumoral pour la cortico-surrénale. En effet, certaines anomalies ne sont retrouvées que dans les adénomes cortico-surrénaliens, c'est le cas des mutations de *GNAS1* (§ I.C.3.b.) ou de *PRKAR1A* et pas dans les cortico-surrénalomes. Cependant, des pertes d'hétérozygotie du locus 17q22-24 (contenant le gène *PRKAR1A*) ont été trouvées avec une forte proportion (53%) dans des cortico-surrénalomes (Bertherat *et al.*, 2003), mais aucune mutation inactivatrice du gène n'a été trouvée. L'absence de mutations de *PRKAR1A* dans les cortico-surrénalomes et leur présence dans les adénomes correspondent à l'inverse de ce qui est observé pour les tumeurs de la thyroïde (Sandrini *et al.*, 2002), ce qui suggère des processus de tumorigenèse impliquant la fonction de la PKA différents d'un type cellulaire à l'autre.

La méconnaissance des mécanismes de tumorigenèse et le manque d'indices fiables de malignité des tumeurs conduisent à ce qu'une forte proportion des tumeurs, ayant un faible score de Weiss (30%), ne puissent pas être diagnostiquées avec certitude. En effet, les médecins ont des difficultés pour prédire de façon fiable leur degré de malignité et donc pour prendre en charge correctement les patients. Il est donc nécessaire de trouver des marqueurs moléculaires ou immunohistochimiques fiables pour aider les médecins à la prise en charge des patients comme c'est le cas pour d'autres tumeurs. Par exemple, la perte d'expression du gène du rétinoblastome est utilisée dans le diagnostic des carcinomes parathyroïdiens (Dotzenrath *et al.*, 1996). De plus, malgré des progrès récents, il existe beaucoup d'inconnues concernant les mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans le déclenchement et la progression tumorale au niveau de la cortico-surrénale. Pour améliorer le diagnostic et permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques, il est nécessaire de rechercher l'origine génétique et moléculaire de ces tumeurs. Dans la dernière partie de ce manuscrit, nous aborderons, essentiellement au travers de modèles animaux, ces aspects pour deux types de lésions de la cortico-surrénale, directement en relation avec le travail expérimental présenté ensuite : les cortico-surrénalomes et les PPNAD.

III.E. Les cortico-surrénalomes et les PPNAD.

III.E.1. Les cortico-surrénalomes : p57^{kip2} et le système IGF.

Un certain nombre de caractéristiques propres à ces tumeurs malignes a été établi au milieu des années 90. L'origine exclusivement monoclonale des cortico-surrénalomes suggère que des anomalies génétiques, apparues dans une seule cellule, induisent le dysfonctionnement d'oncogènes et/ou de suppresseurs de tumeurs conduisant à la transformation tumorale maligne. Les adénomes et les hyperplasies, quant à eux, peuvent avoir une origine mono ou polyclonale (Beuschlein *et al.*, 1994; Diaz-Cano *et al.*, 2001; Gicquel *et al.*, 1994). Par ailleurs, des analyses cytogénétiques ont révélé des remaniements sur des chromosomes peu ou pas affectés dans les autres tumeurs humaines laissant supposer l'intervention d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs spécifiques de la cortico-surrénale (Kjellman *et al.*, 1996).

C'est essentiellement l'analyse génétique du syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) (§ III.C.4.) qui a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires accompagnant le développement des tumeurs malignes sporadiques de la cortico-surrénale. La plupart des problèmes cliniques rencontrés dans le SBW, sur-croissance fœtale et tumeurs, peuvent être expliqués par des altérations du contrôle de la prolifération cellulaire. Dans ce sens, l'activité des gènes *IGF2* et *p57^{kip2}* peut être directement mise en cause dans l'apparition de ces symptômes.

Premièrement, un rôle suppresseur de tumeur pour *p57^{kip2}* est suggéré par la description de mutations inactivatrices observées dans 5% des cas sporadiques des SBW et dans 50% des cas familiaux (Lam *et al.*, 1999). De plus, des travaux ont montré une extinction totale de l'expression du gène *p57^{kip2}* dans plus de 75% des carcinomes cortico-surrénaliens (Barzon *et al.*, 2001; Bourcigaux *et al.*, 2000).

Deuxièmement, la plupart des anomalies survenant dans le locus 11p15.5 conduisent à une expression bi-allélique d'*IGF2* et donc à une élévation de ce facteur dans les tissus affectés par la sur-croissance. De plus, *IGF2* est exprimé dans la surrénale fœtale et dans 85% à 90% des cortico-surrénalomes alors que son expression est relativement faible voir absente dans le tissu sein adulte (Boulle *et al.*, 2000; de Fraipont *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997; Mesiano and Jaffe, 1997; Voutilainen and Miller, 1988).

Les modèles animaux reproduisant une sur-expression d'*IGF2* et une perte de *p57^{kip2}*

	Patients SBW Caspary et al, 1999 Eggenschwiler et al, 1997	Mutant p57 Zhang et al, 1997	Surexpression d'IGF2 Sun et al, 1997	Souris mutantes H19/IGF2R Eggenschwiler et al, 1997	Souris mutantes P57/H19 Caspary et al, 1999
Macroglosie	95%	-	+	-	+
Défauts surrénaliens					
Cytomégalie, tumeurs	94%	+	-	-	-
kystes	69%	-		+	-
Placentomégalie	92%	-		+	+
Viscéromégalie					
Hépatomégalie	85%	-	+	+	-
Néphromégalie	69%	-	+	+	+
Macrosomie	60%	-	+	+	+
Displasie rénale	59%	+		-	+
Défaut de la paroi abdominale					
Omphalocèle	60%	+	-	+	+/-
hernie ombilicale	32%	+			+
Fente du palais	7,1%	+		+	+
Défauts cardiaques	20%	-	+	+	+
Anomalies du squelette	5,5%	-	+	+	+

Tableau 7: Comparaison des différentes anomalies observées entres les patients atteints du syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) et les différents modèles animaux.

Des modèles animaux ont été créés afin de démontrer expérimentalement l'implication d'IGF2 et/ou de $p57^{kip2}$ dans le déclenchement du SBW (tableau 7).

Chez la souris, l'invalidation génique de $p57^{kip2}$ reproduit certains phénotypes observés dans le SBW, comme des défauts de fusion de la paroi abdominale (rappelant l'omphalocèle), des dysplasies des reins et des glandes surrénales, mais pas de gigantisme ni de viscéromégalie (Zhang *et al.*, 1997).

Des souris transgéniques ayant intégré un transgène permettant une sur-expression d'IGF2 de 2 à 3 fois (Sun *et al.*, 1997) présentent de nombreuses caractéristiques du SBW : croissance *in utero* excessive, hypertrophie des reins, de la langue, anomalie du squelette… Le degré d'atteinte, en particulier l'hypertrophie des organes, est corrélé au taux de surexpression d'IGF2 dans les tissus atteints. Dans ces souris sur-exprimant IGF2, les concentrations plasmatiques d'IGF2 sont augmentées. En revanche, l'expression des gènes *h19* et $p57^{kip2}$ n'est pas ou peu modifiée. Il est intéressant de noter que les phénotypes absents dans le modèle de souris où $p57^{kip2}$ est invalidé sont retrouvés ici alors que d'autres comme l'omphalocèle et l'adrénomégalie ne sont pas reproduits (Sun *et al.*, 1997). Ceci suggère l'implication de ces deux gènes dans le syndrome complet.

Il semblerait que des niveaux accrus d'IGF2 pourraient affecter directement ou indirectement $p57^{kip2}$. En effet, on observe une diminution de l'accumulation des ARNm $p57^{kip2}$ chez des embryons de souris sur-exprimant IGF2 suite à l'inactivation du gène *igf2r* (IGF type 2 receptor) (conduisant à une élévation de la biodisponibilité d'IGF2 circulant suite à une diminution de sa dégradation spécifique normalement prise en charge par IGF2R) (Grandjean *et al.*, 2000). Ceci est retrouvé *in vitro* dans des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires traitées avec de l'IGF2 (Grandjean *et al.*, 2000).

Il existe un autre modèle de souris présentant une double inactivation du gène *h19* (conduisant à une expression bi-allélique d'*igf2*) et du gène *igf2r* (Eggenschwiler *et al.*, 1997). Ces animaux présentent des taux d'IGF2 7 à 11 fois plus élevés ainsi que la plupart des phénotypes du SBW dont ceux spécifiques des KO (Knock-out) $p57^{kip2}$, comme l'omphalocèle.

Les double mutants ont été créés, présentant à la fois une sur-expression d'IGF2 et une invalidation de *p57*^{kip2} (tableau 7). Comme on pouvait le supposer, ces animaux reproduisant l'anomalie moléculaire observée chez les malades présentent une symptomatologie beaucoup plus proche du SBW (Caspary *et al.*, 1999).

Si les modèles murins du SBW reproduisent assez fidèlement les anomalies de croissance embryonnaire et la létalité fœtale et néonatale observées chez l'homme, aucun d'eux ne développent de tumeur notamment dans la cortico-surrénale. La raison que nous pouvons invoquer est que les modifications d'expression d'*igf2* et/ou de *p57*^{kip2} chez les souris provoquent invariablement une létalité embryonnaire à partir de E16-E18 ou au mieux périnatale, la survie des animaux ne dépassant pas 2 semaines. Ces morts précoces ne sont sans doute pas favorables à la survenue des phénotypes tumoraux.

Il existe d'autres modèles de souris sur-exprimant IGF2. Wolf *et al.* ont utilisé les séquences régulatrices du gène *PEPCK* (phophoenolpyruvate carboxykinase) de rat pour conduire l'expression d'*IGF2* humain dans des souris transgéniques (Wolf *et al.*, 1994). Le gène *PEPCK* est actif autour de la naissance puis son expression augmente pendant la période post-natale. Ce transgène est exprimé dans différents tissus dont la cortico-surrénale (Zimmer and Magnuson, 1990) et a comme effet de conduire à une hyperplasie du cortex surrénalien associée à une augmentation de la production de corticostérone (Weber *et al.*, 1999). Les taux d'IGF2 circulant dans ces animaux transgéniques sont augmentés de 4 à 6 fois par rapport à des animaux sauvages.

Il semble que le système IGF joue un rôle important dans le développement fœtal et tumoral. En effet, dans les tumeurs cortico-surrénaliennes, d'autres composants du système IGF sont dérégulés. Certaines études ont montré une sur-expression d'IGFBP2 (IGF binding protein-2) et d'IGF1R (IGF type 1 receptor) (Boulle *et al.*, 1998; Ilvesmaki *et al.*, 1993; Ilvesmaki *et al.*, 1998; Logie *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 1997). De plus, des mutations ou des pertes d'hétérozygotie au niveau du gène codant le récepteur IGF2R sont retrouvées dans différentes tumeurs, y compris les tumeurs cortico-surrénaliennes (Leboulleux *et al.*, 2001).

III.E.2. Les PPNAD : implication du gène *PRKAR1A*

Différentes observations suggèrent deux rôles opposés pour le gène *PRKAR1A*. On lui attribue soit un rôle d'oncogène soit de suppresseur de tumeur. En effet, son potentiel rôle d'oncogène est suggéré par sa forte expression dans plusieurs tumeurs et des lignées cellulaires dérivées de tumeurs (Bold *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1995). De plus, la diminution de l'expression de *PRKAR1A* induite par des oligonucléotides antisens conduit à une inhibition de la prolifération cellulaire (Cho-Chung *et al.*, 1989 ; Tortora and Ciardiello, 2002). L'implication de *PRKAR1A* en tant que suppresseur de tumeur est suggéré par les mutations inactivatrices et les fréquentes pertes d'hétérozygotie (LOH) observées dans le locus de ce gène (Kirschner *et al.*, 2000). Dans quelques tumeurs, cependant, la perte d'hétérozygotie n'est pas détectée (Bertherat *et al.*, 2003; Tsilou *et al.*, 2004), suggérant que l'haploinsuffisance seule est responsable du développement tumoral.

Le gène *PRKAR1A* code pour la sous-unité régulatrice RIa de la PKA et comporte des mutations inactivatrices dans 44% des cas familiaux et dans 35% des cas sporadiques du CNC (Casey *et al.*, 2000; Kirschner *et al.*, 2000; Sandrini and Stratakis, 2003). Plus récemment, l'équipe de J. Bertherat a mis en évidence une fréquence en réalité bien plus élevée (82%) de mutations germinales de *PRKAR1A* chez des patients CNC présentant une PPNAD ainsi que dans les cas de PPNAD sporadique isolée (Groussin *et al.*, 2002a; Groussin *et al.*, 2002b). Les seules autres manifestations associées à ce jour à des mutations du gène *PRKAR1A*, en dehors de celles du complexe de Carney ou des PPNAD sporadiques, sont des tumeurs thyroidiennes sporadiques (Sandrini *et al.*, 2002) et quelques adénomes cortico-surrénaliens (Bertherat *et al.*, 2003).

A ce jour, il est possible de corréler le développement des PPNAD à 2 groupes de mutations touchant le gène *PRKAR1A*. Le groupe de loin le plus représenté correspond à des mutations qui affectent la stabilité de l'ARNm et aboutissent à la perte de l'expression de l'allèle muté. Dans la plupart des cas, l'allèle sauvage est éliminé par perte d'hétérozygotie. Le second groupe de mutations, réduit à quelques cas, conduit à l'expression d'une sous-unité tronquée sans perte allélique (Groussin *et al.*, 2002b).

Les modèles animaux d'invalidation totale ou partielle de *prkar1a*

L'invalidation du gène *prkar1a* par recombinaison homologue chez la souris (*prkar1a* -/-) a été faite il y a quelques années par l'équipe de S. McKnight (Amieux *et al.*, 2002) et conduit

	Patients CARNEY Stratakis et al 2001	***prkar1a* +/-** Amieux et al, 2002 Veulgelers et al, 2004	***prkar1a* Δ*2/+*** **(système Cre/lox)** Kirschner et al, 2005	**X2AS** **(antisens)** Griffin et al, 2004a Griffin et al 2004b
Les lésions pigmentées de la peau	77%	-	-	
Les Myxomes				
Cœur	53%	-	-	
peau	33%	-	-	
Les tumeurs endocrines				
Cortico-surrénale (PPNAD)	26%		-	+/-
Testicule (LCCSCT)	33% des ♂	↘ fertilité ♂	-	
Thyroide (nodules ou tumeurs)	5%		+	+
Schwannomes	10%		+	
Acromégalie	10%			
Tumeurs hépatiques		+		
Tumeurs de la rate		+		
Augmentation de l'activité PKA basale	+	+ (*prkar1a* -/-)		+
Augmentation de RIIβ	+			+
Augmentation du ratio PKAII/PKAI	+	+ (*prkar1a* -/-)		+
Perte d'hétérozygotie	+	-	+	+

Tableau 8: Comparaison des différentes anomalies observées entre les patients atteints du syndrome de Carney et les différents modèles animaux.

à une létalité embryonnaire par un défaut de mise en place du mésoderme cardiaque et des anomalies du système nerveux central. Ce phénotype est partiellement sauvé dans un contexte où la sous-unité catalytique Ca est invalidée. En effet, le développement du mésoderme cardiaque est partiellement restauré dans des embryons *prkar1a*-/-;*prkaca*+/- et complètement dans des embryons *prkar1a*-/-;*prkaca*-/-. Cependant, les embryons meurent plus tard au cours du développement embryonnaire.

Par comparaison avec la relative innocuité de l'invalidation des trois autres sous-unités régulatrices de la PKA (RIß, RIIa et RIIß) (Amieux and McKnight, 2002), le phénotype sévère observé lorsque *prkar1a* est invalidé met en avant le rôle essentiel de RIa dans le contrôle de l'activité catalytique de la PKA au cours de la gastrulation mais ne permet pas d'évaluer son implication en tant que suppresseur de tumeur et acteur de l'hyperactivité endocrine.

Un autre modèle d'invalidation du gène *prkar1a* a été créé par une autre équipe (Kirschner *et al.*, 2005). Cette équipe a produit des souris transgéniques dont l'exon 2 du gène *prkar1a* est encadré par des séquences loxP permettant sa délétion après apport de la recombinase Cre. Ce modèle permet, au même titre que le modèle précédant, d'obtenir des souris complètement invalidées pour *prkar1a* (*prkar1a*? 2/? 2), une haplo-insuffisance (*prkar1a*? 2/+) mais surtout d'invalider le gène d'intérêt (*prkar1a*) de façon tissu spécifique en apportant la recombinase Cre sous le contrôle de séquences régulatrices spécifiques de certains tissus. La même équipe a créé un autre modèle de souris transgéniques exprimant dans tout l'organisme un ARN anti-sens de *prkar1a*, inductible après la naissance et qui permet de réduire l'expression de la protéine *RIa* d'environ 50% à 60% selon le tissu (Griffin *et al.*, 2004a; Griffin *et al.*, 2004b).

Puisque l'invalidation totale de *prkar1a* est létale, les études se sont portées sur les souris *prkar1a* +/- (Veugelers *et al.*, 2004) et *prkar1a* ? 2/+ (Kirschner *et al.*, 2005). Bien que ces deux modèles de souris conduisent tout les deux à une perte totale de la production d'une protéine par l'allèle mutant, il existe une différence dans les phénotypes décrits par les deux équipes (tableau 8). Les souris *prkar1a* +/- présentent une prédisposition au développement de sarcomes et de carcinomes hépatiques (Veugelers *et al.*, 2004), alors que les souris *prkar1a* ? 2/+ (Kirschner *et al.*, 2005) développent des Schwanomes, des tumeurs des os et des néoplasies de la thyroide. Cette différence de phénotype n'est pas claire, mais le fond génétique différent des souris utilisées dans les deux études peut en être l'origine.

Le modèle de souris transgéniques exprimant un antisens de *prkar1a* (réduction de 50% de RIa), reproduit partiellement les néoplasies du CNC (tableau 8). L'apparition de tumeurs thyroïdiennes dans ce modèle est clairement corrélée à la diminution de RIa (Griffin *et al.*, 2004a; Griffin *et al.*, 2004b).

Impact des anomalies d'expression du gène *prkar1a/PRKAR1A* sur l'activité PKA

L'inactivation complète de *prkar1a* (*prkar1a* -/-) conduit à une augmentation de l'activité PKA basale (Amieux *et al.*, 2002). Les souris hétérozygote *prkar1a* +/- ne semblent pas présenter de variation de l'activité PKA (Veugelers *et al.*, 2004). En revanche, chez les animaux exprimant l'antisens de *prkar1a* (diminution d'environ 50% de la protéine RIa), on observe une augmentation de l'activité PKA de type II (Griffin *et al.*, 2004a; Griffin *et al.*, 2004b). Comme chez les patients atteints d'un CNC il y a une accumulation accrue de la protéine RIIß chez ces mêmes animaux. De plus, une légère augmentation du ratio PKAII/PKAI est retrouvée dans ce modèle de souris.

***prkar1a/PRKARA1* est il un gène suppresseur de tumeur ?**

Fréquemment, chez l'homme, les mutations inactivatrices du gène *PRKAR1A* sont associées à une perte d'hétérozygotie. En fonction du modèle d'haploinsuffisance murin étudié, on retrouve ou pas des pertes d'hétérozygotie du gène *prkar1a* dans les tumeurs.

Ces modèles d'haplo-insuffisance sont en faveur d'une activité gène suppresseur de tumeurs de RIa reproductible dans l'espèce murine mais les mécanismes conduisant à une augmentation de la fonction endocrine et/ou de l'activité de la PKA dans les PPNAD, responsables du syndrome de Cushing, restent à déterminer.

Il est possible aussi que l'inactivation de *PRKAR1A* puisse affecter d'autres voies de signalisation que celle de la PKA. En effet, il a été observé des altérations de la voie MAP-Kinase (ERK1/2) dans des cellules de patients présentant des mutations de PRKAR1A (Robinson-White *et al.*, 2003).

IV. Projets

L'équipe Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire de l'UMR 6547 est divisée en trois thématiques de recherche :

- Contrôle de l'activité du récepteur des androgènes et des effets non génomiques des stéroïdes.
- Les récepteurs des oxystérols (LXRs) et l'homéostasie du cholestérol.
- Régulation et fonction des gènes AKR1Bs et oncogenèse ciblée.

C'est dans le cadre de cette dernière thématique, dont le gène modèle est *akr1b7*, que s'est inscrit mon DEA puis ma thèse. Plusieurs aspects complémentaires m'ont été confiés. Premièrement, effectuer la caractérisation précise de cellules de cortex surrénalien qui venaient d'être isolées au laboratoire par oncogenèse ciblée et qui, au vu des résultats obtenus, présentent un haut degré de différenciation et constituent à ce jour le meilleur modèle disponible de cellules de zone fasciculée du cortex surrénalien. Deuxièmement, établir le pouvoir oncogénique du facteur IGF2 et anti-oncogénique de $p57^{KIP2}$ dans la genèse de cortico-surrénalomes. Et enfin, évaluer le rôle de la protéine RIa dans l'apparition d'hyperplasies micronodulaires pigmentées des surrénales (PPNAD). Ces deux derniers aspects ont impliqué la création de modèles cellulaires et de modèles de souris exprimant des transgènes dont l'expression est ciblée dans le cortex surrénalien à l'aide des séquences régulatrices du gène murin *akr1b7* et celles du gène humain *CYP11A1*.

Caractérisation biochimique et moléculaire des cellules ATC.

Les connaissances des régions régulatrices du gène *akr1b7*, ainsi que les expériences de transgenèse effectuées au laboratoire afin de les caractériser plus finement, avaient montré qu'il était possible de faire exprimer un gène d'intérêt dans la zone fasciculée du cortex surrénalien de façon spécifique. Cet outil précieux a donc été utilisé pour tenter d'obtenir des lignées cellulaires avec une meilleure différenciation du type fasciculée. Pour cela, il a été créé avant mon arrivée au laboratoire, des souris transgéniques exprimant l'AgT sous le contrôle des séquences régulatrices -510/+41pb du gène murin *akr1b7* (0,5akr1b7-AgT-Int). Deux souris fondatrices, développant des tumeurs surrénaliennes, ont été sacrifiées et les tumeurs de la femelle fondatrice n°1 et du mâle fondateur n°7 ont été mises en culture. La première lignée a été appelée ATC1 (Adrenocortical Tumor Cells 1) et la seconde ATC7-L (L=Left). Par northern-blot, il avait été montré avant mon arrivée que l'AgT, *akr1b7* et la *cyp11b1* répondaient à une stimulation par l'ACTH après 4 passages (Sahut-Barnola *et al.*, 2000). Ces résultats suggéraient fortement que les lignées ATC1 et ATC7-L pouvaient

correspondre à de nouvelles lignées cellulaires présentant une bonne différenciation de type zone fasciculée.

Cela nous a conduit 1) à analyser par spectrométrie de masse et par dosage radio-immunologique (RIA) leur production de stéroïdes et de voir dans quelle mesure cette production était contrôlée par l'ACTH, 2) à contrôler l'expression des acteurs géniques de la stéroïdogénèse et leur sensibilité à l'ACTH, et enfin 3) à rechercher l'expression et la régulation des facteurs de transcription DAX-1 et de SF-1, en réponse à l'ACTH, qui sont essentiels au développement et au maintien de l'état différencié de la surrénale.

A la suite de cela, et puisqu'il avait été possible d'induire des tumeurs spécifiquement dans la surrénale en utilisant les séquences régulatrices -510/+41pb du gène *akr1b7*, il devenait évident que cet outil pouvait être utilisé pour induire des dysfonctionnements spécifiquement dans le cortex surrénalien dans le but de tester l'implication de différents acteurs possibles de la tumorigenèse cortico-surrénalienne et essayer d'obtenir des modèles animaux développant ce type de pathologie.

Projet IGF2, p57^{KIP2} et tumeurs malignes

Les analyses génétiques ont permis d'associer le développement du phénotype malin des tumeurs du cortex surrénalien à des anomalies dans le locus 11p15.5 conduisant à une sur-expression du facteur de croissance IGF2 et à une perte d'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p57^{kip2}. Cependant, il n'existe pas de preuve expérimentale de l'implication directe de la sur-expression de IGF2 et de la sous-expression de p57^{kip2} dans l'initiation du processus tumoral au niveau de la cortico-surrénale. Un des objectifs de ce travail de thèse a été de tester le pouvoir oncogénique de ces dysfonctionnements de deux manières : *ex vivo* dans des cellules de cortico-surrénales différenciées (les cellules ATC1) et *in vivo* dans des souris transgéniques.

Projet RIa et PPNAD

Les hyperplasies micronodulaires pigmentées des surrénales (PPNAD) sont des tumeurs endocrines bénignes hypersécrétantes du cortex surrénalien, retrouvées chez certains patients présentant un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH. Les PPNAD sont retrouvées chez 20-30% des patients atteints du complexe de Carney (CNC). Le gène PRKAR1A, codant la sous-unité régulatrice RIa de la PKA et localisé en 17q22-24, présente une fréquence élevée de mutations dans le CNC et dans les cas de PPNAD isolées. A ce jour, il est possible

de corréler le développement des PPNAD à deux types de mutations touchant le gène *PRKAR1A* : (i) une grande majorité de mutations dites inactivatrices affecte la stabilité de l'ARNm et l'allèle sain est éliminé par perte d'hétérozygotie ; (ii) le second groupe de mutations, réduit à quelques cas, conduit à l'expression d'une sous-unité RIa tronquée sans perte allélique. La première mutation de ce dernier groupe qui a été décrite conduit à la production d'une protéine tronquée (RIa ? 184-236) présente dans les tissus normaux et tumoraux du patient. Cette protéine agirait de manière transdominante sur la protéine sauvage. Le dernier volet de cette thèse a été la création de souris transgéniques exprimant spécifiquement dans la surrénale cette sous-unité RIa ? 184-236 afin de tester son implication dans l'apparition de PPNAD mais aussi dans le but de créer un modèle physio-pathologique de cette atteinte rare du cortex surrénalien.

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

Caractérisation biochimique et moléculaire des cellules ATC.

I. Introduction

Le gène *akr1b7*, codant une protéine appartenant à la famille des aldo-céto réductases réduisant l'isocaproaldéhyde (Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999), a été initialement décrit comme un marqueur spécifique du canal déférent de souris (Taragnat *et al.*, 1986) dans lequel, son expression est dépendante des androgènes. Son expression a été ensuite mise en évidence dans la zone fasciculée du cortex surrénalien (Aigueperse *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 1995) sous le contrôle de l'hormone hypophysaire ACTH (Martinez *et al.*, 1999). Ce contrôle mobilise la voie de l'AMPc comme le montre l'utilisation de la lignée cellulaire cortico-surrénalienne Y1 (Aigueperse *et al.*, 1999). Dans les cellules Y1, la séquence -510pb/+41pb (0.5kb) du promoteur de *akr1b7* confère une expression et une stimulation transcriptionnelle maximale du gène rapporteur CAT (chloramphenicol acetyl transferase) en réponse à la forskoline (Aigueperse *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 1998). Des expériences de transgenèse chez la souris montrent que le contrôle au cours du développement, le ciblage surrénalien au niveau de la zone fasciculée et la régulation par l'ACTH sont supportés par la construction 0,5*akr1b7*-CAT-Int contenant les séquences régulatrices –510/+41pb et les introns 1 et 2 du gène *akr1b7* (Martinez *et al.*, 1999; Sahut-Barnola *et al.*, 2000).

Dans le but d'obtenir des modèles cellulaires alternatifs aux cellules Y1 et affichant de meilleures caractéristiques différenciées, ces séquences régulatrices du gène *akr1b7* ont été utilisées dans des expériences d'oncogenèse ciblée visant à diriger l'expression de l'AgT dans la zone fasciculée du cortex surrénalien. Deux souris fondatrices, développant des tumeurs surrénaliennes, ont été sacrifiées et les tumeurs de la femelle fondatrice n°1 et du mâle fondateur n°7 ont été dispersées dans des boites de culture. La première lignée a été appelée ATC1 (Adrenocortical Tumor Cells 1) et la seconde ATC7-L (L=Left). Il avait été montré par northern-blot avant mon arrivé au laboratoire que l'*AgT*, *akr1b7* et la *cyp11b1* répondaient à une stimulation par l'ACTH après 4 passages (Sahut-Barnola *et al.*, 2000). Ces résultats suggéraient que les lignées ATC1 et ATC7-L pouvaient correspondre à de nouvelles cultures cellulaires présentant une bonne différenciation de type zone fasciculée. Ces lignées cellulaires ont été amplifiées sur des dizaines de passages et nous avons approfondi leur

caractérisation biochimique et moléculaire. Cela nous a conduit 1) à analyser par spectrométrie de masse et par dosage radio-immunologique (RIA) leur production de stéroïdes et de voir dans quelle mesure cette production était contrôlée par l'ACTH, 2) à contrôler l'expression des gènes impliqués dans les différentes étapes de la stéroïdogenèse et leur sensibilité à l'ACTH, et enfin 3) à rechercher l'expression et la régulation des facteurs de transcription DAX-1 et de SF-1 en réponse à l'ACTH qui sont essentiels au développement et au maintien de l'état différencié de la surrénale. L'ensemble de ces points fait l'objet du premier article.

Bien que la production des glucocorticoïdes surrénaliens (cortisol chez l'homme et corticostéronne chez les rongeurs) soit contrôlé majoritairement par l'ACTH, il existe un contrôle par les hormones sexuelles et notamment par les oestrogènes dont l'impact sur les gènes acteurs de la stéroidogenèse était jusque là complètement inconnu (Atkinson and Waddell, 1997; Lo *et al.*, 2000). Des travaux récents réalisés au laboratoire ont mis en évidence l'effet stimulateur des oestrogènes sur l'expression cortico-surrénalienne des gènes codant AKR1B7, SR-BI (récepteur des HDL) et CYP11A1. Cependant, leur expression dans des cellules cortico-surrénaliennes en culture primaire est insensible aux oestrogènes (Lefrançois-Martinez A.M. communication personnelle). Les oestrogènes stimulant la production de la prolactine (PRL) au niveau de l'hypophyse (Gottesfeld and Liehr, 1987), celle-ci est apparue comme un candidat potentiel pour transmettre les effets des oestrogènes aux acteurs de la stéroïdogenèse. En effet, il est clair que la signalisation PRL exerce un effet stimulateur sur la production de stéroïdes cortico-surrénaliens puisque des souris déficientes pour le récepteur de la PRL (*R-PRL*-/-) (Ormandy *et al.*, 1997) présente une corticostéronémie au moins 5 fois plus faible que les souris sauvages (Chambon C., rapport de Master II). Enfin, chez des souris *R-PRL*-/- castrées, l'injection d'oestrogènes ne stimule pas la corticostéronémie, à l'inverse de ce qui est observé chez des souris sauvages (Lefrançois-Martinez A.M. communication personnelle). Ces résultats montrent que les effets stimulateurs des oestrogènes sur le taux de corticostérone sont dépendants de la signalisation PRL. Dans le deuxième article j'ai utilisé le modèle de lignées cellulaires ATC pour démontrer un effet direct de la PRL sur la stéroïdogenèse et sur l'expression de ses gènes clés, effet que j'ai comparé à celui de l'ACTH.

II. Résultats

II.A. ARTICLE 1

Article accepté à Endocrinology le 13 Janvier 2006

ACTH-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis*.

Running Title : regulation of SF-1/DAX-1 ratio in ZF cell lines

Bruno Ragazzon, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Pierre Val, Isabelle Sahut-Barnola, Colette Tournaire, Céline Chambon, Jean-Louis Gachancard-Bouya[§], René-Jean Begue[§], Georges Veyssière, Antoine Martinez

From Unité Mixte de Recherche 6547 Centre National de la Recherche Scientifique-Université Blaise Pascal Clermont II, Génétiques des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire, Complexe Universitaire des Cézeaux, 63177 Aubière, France. [§] *Laboratory of Hormonology, Gabriel Montpied Hospital, groupe hospitalier Saint-Jacques, BP 69, 63003 Clermont-Ferrand cedex 1, France*

Address correspondence to : Antoine Martinez, UMR6547 CNRS-Université Blaise Pascal Clermont II, GEEM, Complexe Universitaire des Cézeaux, 24, av. des Landais, 63177 Aubière cedex, France, Tel. 33 4 73 40 74 09, Fax. 33 4 73 40 70 42, E-Mail : **antoine.martinez@univ-bpclermont.fr**

Key words : adrenocortical cell lines, *zona fasciculata*, steroidogenesis, AKR1B7, SF-1, DAX-1

* This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université Blaise Pascal Clermont II, Association de la Recherche contre le Cancer (Grants ARC 4471 and 7723).

Disclosure statement: B. R., AM.LM., P.V., I.S., C.T., C.C., JL.GB., RJ.B., G.V.,A.M. have nothing to declare.

ABSTRACT

We established the first adrenocortical tumor cell lines (ATC) with complete *zona fasciculata* (ZF) cell phenotype from tumors induced in transgenic mice by large T-antigen of simian virus 40 under the control of the aldose reductase-like *akr1b7* gene promoter. ATC lines produced high amounts of corticosterone and were responsive to ACTH. All genes that are supportive for glucocorticoid synthesis including *cyp21a1* and *cyp11b1* were expressed and most of them were transiently up-regulated by ACTH at transcriptional level : stimulation culminated after 3-6h and returned to basal levels after 24h. Making advantage of these cells, we have examined the effect of ACTH on DAX-1 and SF-1, two transcription factors known to respectively repress and activate adrenocortical steroidogenesis by acting on common target genes. According to their antagonistic activities, DAX-1 mRNA and protein levels were transiently down-regulated by ACTH whereas those of SF-1 were stimulated, with kinetics paralleling those of steroidogenic genes expression, notably of two known SF-1 target genes, *star* and *akr1b7*. This suggests an essential role of SF-1/DAX-1 proteins ratio in order to achieve proper ACTH control of steroidogenic gene expression in cells derived from ZF. This was confirmed in mice adrenals, where repression of *dax-1* gene and concomitant up-regulation of *sf-1*, *star* and *akr1b7* genes were observed in response to ACTH stimulation. In conclusion, using both unique differentiated cell lines and *in vivo* approaches, we provide the first evidence that hormonally-induced changes in SF-1/DAX-1 ratio are part of the molecular arsenal of ZF cells to fine tune ACTH responsiveness.

INTRODUCTION

The mammalian adrenal cortex is an endocrine gland composed of cells that segregate into separate zones with distinct functions: the *zona glomerulosa* (ZG) produces aldosterone, the *zona fasciculata* (ZF) synthesizes corticosterone in rodents and cortisol in humans and the *zona reticularis* (ZR) secretes androgen precursors in humans but not in rodents (1, 2). Differential production of adrenal steroid hormones results from both the proper sensitivity of each zone to respond to specific secretagogues (angiotensin II, potassium, adrenocorticotropic hormone) that stimulate steroidogenic genes transcription and the restricted localization of the hydroxylases that catalyse the terminal steps of steroidogenesis. Indeed aldosterone production in the ZG is essentially under the control of angiotensin II and potassium acting *via* the calcium messenger system, whereas adrenocorticotropic hormone (ACTH) is the main regulator of corticosterone production in the ZF and exerts its effect at least by generating cAMP as an intracellular messenger. On the other hand, zonal differences in the steroid products are attributable to the zone specific expression of two structurally related cytochrome P450 hydroxylases, aldosterone synthase (CYP11B2) and 11ß-hydroxylase (CYP11B1) that convert deoxycorticosterone into aldosterone in the ZG and into corticosterone in the ZF, respectively (3). By contrast, all the initial reactions leading to the conversion of cholesterol to deoxycorticosterone are catalyzed by the sequential action of three enzymes expressed throughout the adrenal cortex, cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (CYP11A1), 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β–HSD) and cytochrome P450 21-hydroxylase (CYP21A) (4). In rodents adrenals, intracellular uptake and intramitochondrial transfer of cholesterol are facilitated by the scavenger type B class I (SR-BI) receptor, the HDL receptor and by the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), respectively (5-7). Thus, ACTH triggers glucocorticoid biosynthesis in the ZF by inducing a coordinated up-regulation of all the genes involved in the cholesterol delivery and in its conversion into steroid hormones (8). In addition, maintaining full steroidogenic activity of ZF cells may require the coordinated control by ACTH of a third group of genes encoding detoxifying enzymes, the aldose reductases AKR1B7 and AKR1B1 and the manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) that scavenge deleterious byproducts of steroidogenesis *e.g.* aldehydes (isocaproaldehyde and 4-hydroxynonenal) and superoxide radicals, respectively (9-11).

Genetic ablation of the steroidogenic factor-1 (SF-1) showed that it is essential for both adrenal and gonadal differentiation and development but the complete lack of these organs in SF-1 knock out mice impedes evaluation of its role in the maintenance of differentiated functions (12, 13). Many studies, essentially based on cell transfections, have focused on the identification of transcription factors that could explain hormonal and cell-specific control of genes encoding steroid hydroxylases, StAR protein, HDL receptor or the detoxifying enzyme AKR1B7 (14-19). These studies have prominently shown that i) based on mutational analyses of promoter sequences, SF-1 behaves as a common mediator of the hormonal/cAMP response of many steroidogenic genes in both adrenals and gonads, and ii) SF-1 is not sufficient for this process which requires functional interactions between SF-1 and other transcription factors *e.g.* Sp1, C/EBPβ, GATA-4, CREB, AP-1 (reviewed in (13)), as shown by the inability of a pure SF-1 binding site to confer hormonal/cAMP responsiveness to a minimal promoter (19). Therefore, the molecular mechanisms involved in SF-1-mediated hormonal/cAMP response remain poorly understood although variations in its accumulation and phosphorylation upon cAMP stimulation have been reported (20-23). In both human and mouse, mutations in either SF-1 or DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal-

adrenal hypoplasia congenita critical region on X-chromosome, gene 1) lead to impaired adrenal function and because their expression colocalizes in many endocrine cells (24, 25), it was proposed that these two factors may interact to control a common genetic cascade (26, 27). Cell transfection experiments suggested that DAX-1 functions antagonistically with SF-1 and acts as a powerful repressor of basal and cAMP-stimulated steroid production (28-31). Introduction of the DAX-1 mutation (DAX-$1^{-/Y}$) in SF-1 heterozygous mice rescues the adrenal phenotype and reverses the blunted stress response observed in SF-1+/- animals, indicating that the two factors antagonistically interact in the adrenal *in vivo* to regulate ACTH sensitivity (32). Hence, endocrine cells may modulate their response to pituitary hormones by controlling the balance between SF-1 and DAX-1. Indeed, DAX-1 expression was shown to be repressed by FSH, LH and angiotensin II in Sertoli, Leydig and adrenal glomerulosa cells, respectively (33-36). However, because adrenocortical cell lines exhibiting a complete ZF phenotype were not available, a potential effect of ACTH on the endogenous balance between SF-1 and DAX-1 levels in the ZF could not be evaluated. Indeed, most of our knowledge of the mechanisms regulating adrenocortical steroidogenesis stems from studies in either mouse Y-1 or human NCI-H295 tumoral cell lines, both of which are incompletely differentiated : whereas Y-1 cells are devoid of DAX-1 and cytochrome P450 21-hydroxylase, H295 cells simultaneously exhibit phenotypes of ZG and ZF. Furthermore both lines are poorly responsive to ACTH (30, 37-41).

Taking advantage of the promoter for the *akr1b7* gene which is able to target adrenal expression in the ZF *in vivo*, we developed adrenocortical cell lines derived from SV40 large T antigen-induced tumors obtained by targeted tumorigenesis in transgenic mice (42-44). These cell lines showed a complete and stable ZF phenotype over more than 25 passages. By analysing expression of all the major actors of steroidogenesis in response to ACTH in these newly developed cell lines as well as in mouse adrenal cortex, we provide evidence for the essential role of the balance between SF-1 and DAX-1 levels in ACTH-mediated stimulation of steroidogenic genes expression and steroidogenesis in the *zona fasciculata*. Our data also point out the detoxifying enzyme gene *akr1b7* as a new target for the antagonistic partners DAX-1 and SF-1.

MATERIALS AND METHODS

Establishment and culture of ATC cell lines

Two cell lines were established from adrenal tumors of two transgenic mice harbouring the large T-antigen of simian virus 40 under the control of the adrenocortical specific promoter of *akr1b7*. These cell lines were designated ATC1 and ATC7-L for Adrenocortical Tumor Cell of founder transgenic mice 1 and 7-Left adrenal respectively (44). ATC cells were cultured on polylysin-coated 10 cm tissue culture dishes in a 1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's F-12 medium (DMEM-F12) at 37°C in a 5% CO_2-95% air atmosphere. The medium was supplemented with insulin (10 mg/ml), transferrin (5.5 mg/ml), and selenium (5 ng/ml) (ITS), L-Glutamine (2 mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml), 2.5% horse serum and 2.5% fetal bovine serum. The culture medium was changed every two days. Cells were starved 24 h in minimum medium (without serum) before the addition of ACTH (fragment 1-24), forskolin, actinomycin D or cycloheximide (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) at times and concentrations indicated in figure legends.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, and permeabilized in the presence of phosphate-buffered saline (PBS) and 0.2% Triton for 8 min. Cells were incubated overnight at 4°C with anti-SV40 Large T antigen (kindly provided by Dr. D. Hanahan, University of California, San Francisco, CA) or anti-AKR1B7 antiserum

L3 (10) polyclonal antibodies used at a dilution of 1:2000 and 1:500, respectively. After washing in PBS, non-specific protein-binding sites were blocked by incubation with PBS and 5% goat serum. Incubation with the FITC (fluorescin isothiocyanate) anti-rabbit IgG (1:200) was carried out for 1 h at room temperature. Cells were washed in PBS and were observed under UV irradiation with a photonic microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

Flow cytometry

Cell cycle analysis for the determination of the cell DNA content was undertaken after propidium iodide labelling of cells. ATC1 ant ATC7-L cells were harvested and washed in PBS. Pellets were resuspended in RNAse A (500 µg/ml), propidium iodide (50 µg/ml) solution and kept 1 h at 4°C in the dark. Cell suspensions were analyzed using Beckman Coulter FACS apparatus (Beckman Coulter, Paris, France). For control samples, total blood from mouse was collected from the inferior *vena cava* and a 200 µl aliquot was used in FACS analyses.

Analysis of steroid production

Cells were starved 24 h in serum free medium and then cultured in the same medium in the presence or absence of ACTH. Gas-liquid Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of steroids secreted in serum free media of cells cultured for 30 h in presence or absence of ACTH was done as previously described (45). Corticosterone concentrations in culture media were determined by radioimmunoassay (RIA) using a commercially available kit (ICN Biomedicals, Orsay, France).

Analysis of RNA

Total RNA was isolated from cells and tissues with TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (25 µg) was separated in denaturing formaldehyde/formamide agarose gel and transferred onto Hybond N+ nylon membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). cDNA fragments of $p57^{kip2}$, *igf2*, *mc2r*, *sr-b1*, *star*, *cyp11a1* and *cyp21a1* were isolated by RT-PCR, starting from 2 µg mouse adrenal total RNAs, using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and Taq polymerase (Promega Corp., Charbonnière, France) with the following primer pairs: $p57^{kip2}$ (forward, 5'-TGAACGCCGAGGACCAGAA-3'; reverse, 5'-TCTCTTGCGCTTGGCGAAGA-3'), *igf2* (forward, 5'-CCAGTGGGGAAGTCGATGTT-3'; reverse, 5'-GATGGTTGCTGGACATCTCC-3'), *mc2r* (forward, 5'-CTGACATGTTGGGCAGTCTG-3'; reverse, 5'-TCTGGGCTCCGAAAGGCATA-3'), *sr-b1* (forward, 5'-TCCCTCATCAAGCAGCACGT-3'; reverse, 5'-ATTCTGGACGCCCGTGAAGA-3'), *star* (forward, 5'-CAGATGTGGGCAAGGTGTT-3'; reverse, 5'-GATAGGACCTGGTTGATGAT-3'), *cyp11a1* (forward, 5'-ACCCCAAGGATGCGTCGATA-3'; reverse, 5'-CTGAAGTCTCGCTTCTGCCT-3'), *cyp21a1* (forward, 5'-ACCCTTCACGACTGTGTCCA-3'; reverse, 5'-TGCTAGCCCTAGTTGCACGA-3'), rat *cyp11b1* (forward, 5'-AGGGAGCCTTACCATGGATG-3'; reverse, 5'-CCTGAGTTATTAGTGCCGCCA-3'). The ligation of RT-PCR products was performed in pGEMT-easy vector (Promega Corp., Charbonnière, France) and the fragments for the cDNA probes were generally excised by *Eco*RI digestion with the exception of *cyp11b1* cDNA probe that was excised by *Sph*I/*Nde*I digestion. The probe used to detect *akr1b7* mRNA was obtained by pGEM-akr1b7 digestion with *Eco*R1 and *Bam*H1 (18). Mouse *gata4* and *gata6* probes were excised from pBS-m-*gata4* by *Not*I/*Kpn*I digestion and from pCRII-m-*gata6* by *Eco*RV/*Hind*III digestion (kindly provided by Dr. Wilson DB, Washington University

School of Medicine, St. Louis, USA). Mouse *sf-1* probe was extracted from pCMV5-*sf-1* by *Eco*RI digestion (a kind gift of Dr. KL Parker, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA). Mouse *dax-1* probe was extracted from pSG.mDAX-1 by *Eco*RI/*Bam*HI digestion (kindly provided by Dr. E Lalli, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne Sophia-Antipolis, France). To normalize the loading of RNAs, northern blots were stripped and rehybridized with a mouse *ß-actin* or *gapdh* probes excised from pGEM-7ZF-*ß-actin* by *Eco*RI/*Bam*HI digestion and from pGEMT-easy-*gapdh* by *Eco*RI digestion, respectively. All cDNA fragments used as probes were labelled with the α^{32}P-dCTP NEBlot kit (New England Biolabs, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). Prehybridization was carried out for 2h at 65°C in a solution containing 3X SSC (standard sodium citrate buffer), polyvinylpyrrolidone (0.2%), Ficoll (0.2%), polyethyleneglycol (5%), glycine (1%), SDS (1%) and 100 µg/ml sonicated salmon sperm DNA. Hybridization was performed overnight in the same solution in the presence of labelled probes. After washing, blots were exposed to an imaging screen and visualized using a BioRad molecular imager FX phosphor-imager (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Hybridization signals were analyzed using Quantity One quantification software (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). All northern blot analyses using total RNA of ATC1 or ATC7-L lines were performed in at least three independent experiments.

RT-PCR

The isolated total RNAs were treated with amplification grade DNase I (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France) to remove trace amounts of genomic DNA. The DNase-treated total RNAs (1 µg) were reverse-transcribed by Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Promega Corp., Charbonnière, France) according to the manufacturer's instructions and amplified using Taq DNA polymerase (Promega Corp., Charbonnière, France) by PCR. Nucleotide sequences of the specific primers used were: *dax-1* (forward, 5'-AAGCCAGGTCCCTCTTGTAC-3'; reverse, 5'-TACAGTAGGACAGCTGCCAC-3'); *ß-actin* (forward, 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3'; reverse, 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'). These primer pairs yielded PCR products of 365 and 242 bp for *dax-1* and *ß-actin*, respectively. PCR consisted of 20 cycles of the following steps: denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 30 sec at 59°C, extension for 50 sec at 72°C. Twenty percent of the PCR product were resolved on a 1.5% agarose gel and transferred onto Hybond N+ nylon membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). The specificity of the RT-PCR products was determined by hybridizing the membranes with cDNA fragment of *dax1* and *ß-actin* labelled with the α^{32}P-dCTP NEBlot kit (New England Biolabs, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). Blots were visualized and analysed with BioRad molecular imager FX phosphor-imager (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

Western Blot Analysis

Cell samples and frozen adrenals samples were homogenized in buffer C: 20mM HEPES (pH7.6)/0.2mM EDTA/1.5mM MgCl2/0.42M NaCl/0,5mM DTT/25% glycerol/ plus 0.2% NP40 and a cocktail of protease inhibitors (Complete^{TM} protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics, Meylan, France). The concentration of soluble proteins was determined by the Bradford method (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Proteins were subjected to SDS-PAGE on 10% acrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Non-specific protein-binding sites were blocked by incubation for 1h at room temperature in 50mM Tris-HCL pH8, 150mM NaCl and 0,1% Tween 20 (TBS-T) containing 10% non fat dry milk. Incubation

with primary polyclonal antibodies [anti-AKR1B7 L3 antiserum at 1:3000 (10); anti-StAR at 1:2000 (46); anti-SF-1 at 1:2000 (Upstate Biotechnology, Euromedex, Mundolsheim, France); anti-β-ACTIN at 1:2000 (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) or monoclonal anti-DAX-1 2F4 at 1:1000 (33) was carried in the same buffer overnight at 4°C. After washing in TBS-T, membranes were incubated for 1 h at room temperature with the peroxydase-conjugated anti-rabbit IgG at 1:10000 (P.A.R.I.S., Compiègne, France) or peroxidase-conjugated anti-mouse Kappa at 1:5000 (Southern Biotechnology, Clinisciences, Montrouge, France). The specific complexes were detected using the enhanced chemiluminescence (ECL®) system from Amersham Pharmacia Biotech.

Animals and treatments

Animal studies were conducted in agreement with standards described by the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals as well as with the local laws and regulations applicable to animal manipulations in France. Adult male CD1 mice were injected with vehicle (sesame oil), dexamethasone acetate for 5 days (75 µg twice daily; Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France), or dexamethasone acetate (5 d) plus long-acting ACTH (1.2 U, im, daily; Synacthene, Novartis Pharma S.A., Rueil-Malmaison, France) for the last 6h or 24h. Adrenal glands were removed and total RNAs or proteins were extracted. The Southern blot in figure 5A represents a typical experiment from one animal (2 adrenals) and the corresponding quantification shown below is the mean of experiments performed with four animals for each condition; in figure 5B each lane represents pooled samples from three animals (6 adrenals).

Cell transfection

HeLa cells were maintained in DMEM with Glutamax supplemented with penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 5% fetal bovine serum. HeLa cells were transfected in 6-wells plates 24 h after seeding at a density of 300.10^3 cells per well in complete medium. Cells were transfected for 29 h with Exgen500 reagent (Euromedex, Mundolsheim, France) according to manufacturer's instructions. In figure 6A HeLa cells were transfected with 1 µg reporter gene, 5 ng pCMV5-SF1, encoding human SF-1 and increasing amounts of pCMV-DAX-1 expression vector, encoding human DAX-1 (a kind gift of Dr J.L. Jameson, Chicago, USA) or corresponding pCMV empty vector (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Total vector amount was kept constant to 1.1 µg by co-transfection of pBL-CAT3 empty vector as carrier DNA. In figure 6B HeLa cells were transfected with 1 µg reporter gene, 2 ng pRLSV40, 5ng pCMV5-SF-1 and 5 ng pCMV-DAX-1 or empty pCMV. The *luc* reporter constructs driven by the 0.5-kb *akr1b7* gene promoter (-510/+41) pGL3-0.5 wild type and the corresponding mutants for the SF-1 sites were already described (19). Transfection of ATC1 cells was conducted in 6-wells plates using Metafectene™ reagent (Biontex Laboratories GmbH, Münich, Germany) according to the manufacturer's instructions. ATC1 cells were seeded at a density of 400.10^3 cells per well and transfected with 2 µg of reporter constructs and 5 ng pRLSV40 in serum free ATC medium for 19 h and then induced for 6 or 12 h with 10^{-7}M ACTH (fragment 1-24) or 1mM 8Br-cAMP in absence or presence of 5 µM H89 PKA inhibitor (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France). The *luc* reporter constructs transfected in ATC1 cells were driven either by murine *dax-1, star* or *akr1b7* genes promoters: -2.5kDax was a gentle gift of Dr KI Morohashi (National Institute of Basic Biology, Okazaki, Japan), -966Star was provided by Dr DJ Mangelsdorf (University of Southwestern Medical Center, Dallas, USA), and pGL3-1.8 was constructed by subcloning the –1804/+41 fragment of the *akr1b7* gene excised from the p1.8CAT reporter construct (47) into the Sma1 and BglII sites of pGL3 vector. Luciferase and Renilla assays were performed in an automated luminometer with GenofaxA and

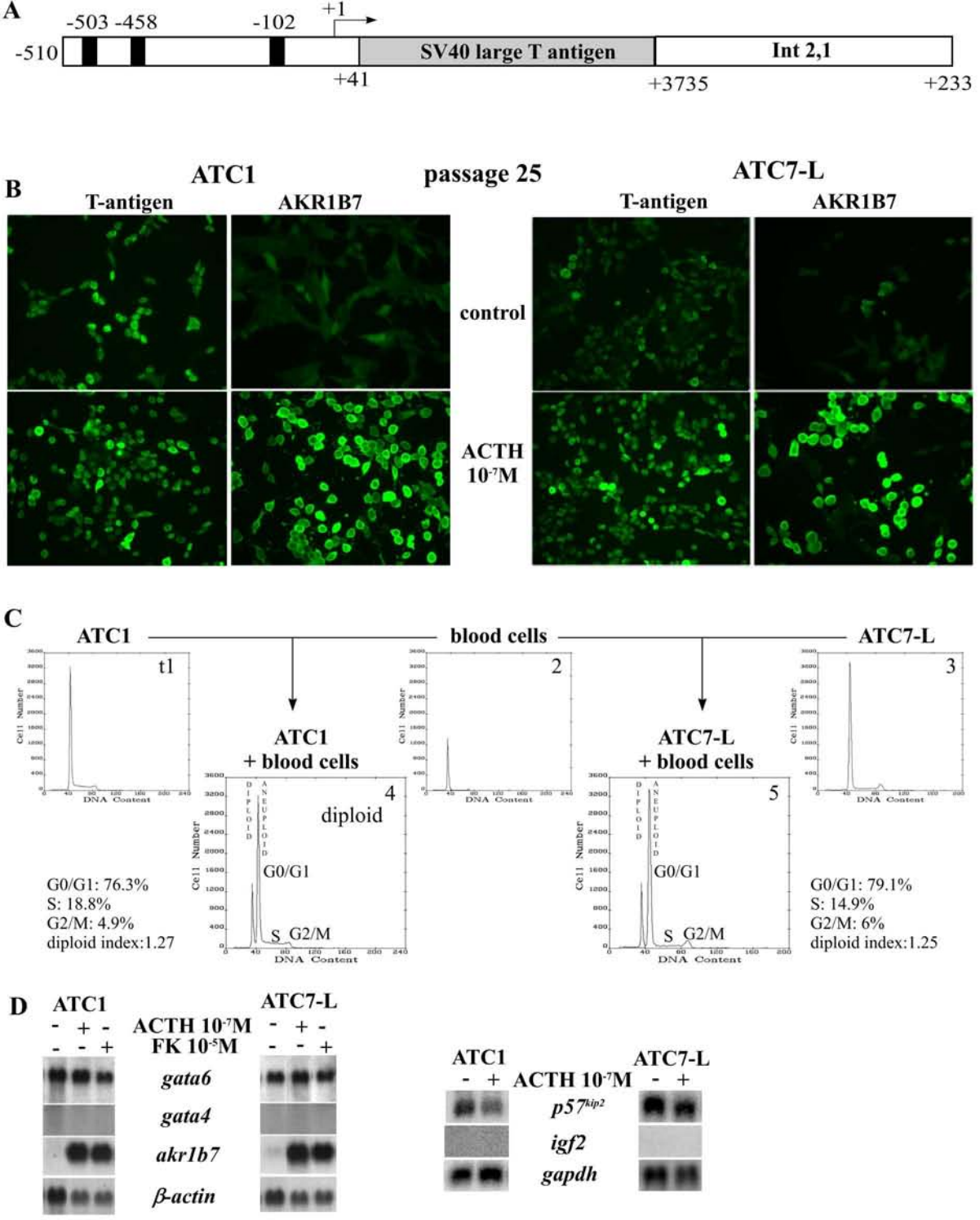


Figure 1

A, Structure of the transgene used for production of transgenic mice carrying the SV40 large T antigen gene under control of the *akr1b7* promoter (-510/+41). The *arrow* points out the transcription start site (+1). Binding sites for SF-1 factor (-503, -458, -102) are indicated. Int 2, 1 (+3735/+233) sequence containing the *akr1b7* first intron, second exon, and second intron was inserted in an inverted position downstream the polyadenylation signal. **B**, Hormonal responsiveness of *akr1b7* gene and transgene in ATC1 and ATC7-L cell lines. In order to test the hormonal responsiveness, cells (passage 25) were starved for 24 h in minimum medium and were cultured 24h in the presence or absence of ACTH (10^{-7}M). Then, T antigen and AKR1B7 immunocytochemistry was performed as described in *Materials and Methods*. **C**, Flow cytometry analysis of ATC1 and ATC7-L cells (passage 27). Cells were stained with propidium iodide for FACS analysis. DNA content was analyzed by flow cytometry. Total diploid blood cells were used to standardize the apparatus. In addition to the major peak of diploid blood cells (graph 2), the DNA histograms of ATC1 and ATC7-L cells mixed with blood cells (graphs 4 and 5) exhibit two supernumerary peaks corresponding to the G0/G1 and G2/M peaks of ATC1 and ATC7-L cells. Graphs 1 and 3 show histograms of ATC1 and ATC7-L cells alone, respectively. **D**, Expression of markers of malignancy in ATC cells. The northern blot was prepared with 25 µg of total RNA in each lane and transferred onto a nylon membrane, and the filter was successively hybridized with the indicated ^{32}P-labeled probes.

GenofaxB reagents (Yelen, Ensue la Redonne, France).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher t test. Values of $p<0.05$ were considered significant and are presented under "Results."

RESULTS

Establishment of ACTH-responsive adrenocortical cell lines from *akr1b7*-SV40 Tag transgenic mice

We had previously demonstrated that DNA fragments of the *akr1b7* gene enclosing the 0.5-kb promoter and intronic sequences (Fig. 1A) were able to confer *zona fasciculata* specific and ACTH regulated expression to reporter genes in transgenic mice, recapitulating the essential features of the endogenous gene expression in the adrenal gland (42, 43). These *cis*-acting sequences driving the SV40 large T antigen were shown to induce the formation of cortical tumors in two founder transgenic mice (44). The cells from two of these independent tumours, ATC1 and ATC7-L, were propagated for up to 40 passages without crisis, indicating immortalization. The analyses presented hereby were all conducted between 25 and 35 passages. The doubling times for both the ATC1 and ATC7-L cells were about 22-24 h in basal conditions. To determine the homogeneity and the responsiveness of these cells to ACTH, we assayed control and ACTH-treated cells for T-antigen and AKR1B7 by immunocytochemistry (Fig. 1B). In the control condition, T-antigen positive nuclear staining was detected in ATC1 and ATC7-L cells while AKR1B7 staining remained undetectable or very low. When 10^{-7}M ACTH was added to the medium for 24 h, we observed an increased intensity of T-antigen nuclear staining and a vigorous responsiveness of AKR1B7 cytoplasmic staining in both lines. Note that both lines responded to ACTH with a clear change in cell morphology from flat to round shape. The superposition of immunocytochemical stainings and Hoechst nuclear staining indicated that the whole cell population appeared sensitive to the hormone (not shown). Homogeneity of the cell population was further confirmed using flow cytometry as shown by the unique profile exemplified by the major peaks recorded with the ATC1 and ATC7-L cell samples (Fig. 1C). This analysis also indicated that ATC1 and ATC7-L tumoral cells had retained a near-diploid state (diploid index 1.27 and 1.25, respectively).

Because immunocytochemistry is an approximate index to evaluate the hormonal responsiveness of the cells, we compared their responsiveness to ACTH and to forskolin, a potent inducer of cAMP-dependent protein kinase signalling, using northern blot analyses. As seen in Fig. 1D (left panel), rather undetectable in the control conditions, the *akr1b7* mRNA was strongly induced to similar levels in both tumor lines treated with either 10^{-7}M ACTH or 10^{-5}M forskolin for 6h. By contrast, angiotensin II or calcium ionophore A23187 failed to induce *akr1b7* gene expression, and CYP11B2 (aldosterone synthase) was neither detected in basal condition nor in presence of these inducers (not shown). Finally, because T-antigen is known to induce a broad spectrum of tumor phenotypes we looked for the expression of markers of malignancy of adrenal tumors (*gata-4* and *igf2*) and of genes whose expression is associated to a more differentiated phenotype (*gata-6* and $p57^{kip2}$). As revealed by northern blot analyses (Fig. 1D, left and right panels), ATC lines contain easily detectable levels of *gata-6* and $p57^{kip2}$ mRNAs while neither *gata-4* nor *igf2* mRNAs are detected. Note that the abundance of *gata-4* mRNA was unchanged upon hormonal treatment while $p57^{kip2}$ appeared slightly repressed.

Altogether these data established that ATC1 and ATC7-L lines were composed of very homogenous adrenocortical cell populations that were derived from rather differentiated tumors and had conserved functional ACTH receptors.

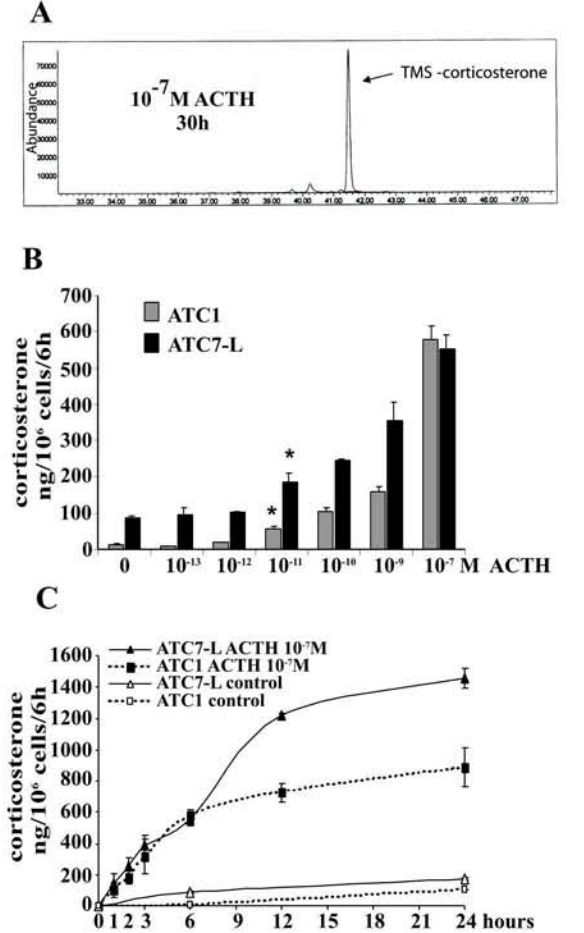


Figure 2
Analysis of steroid production of ATC lines. **A**, Gas-liquid chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of culture medium from ATC1 cells. **B**, Response of ATC1 and ATC7-L cells with increasing doses of ACTH. Cells were incubated for 6h with increasing doses of ACTH and corticosterone productions in the culture medium were assayed by RIA. *, significantly different from corticosterone productions recorded in presence of 10^{-12}M ACTH ($p < 0.01$). **C**, Time course of corticosterone production by ATC lines stimulated with 10^{-7}M ACTH (assayed by RIA). Results represent the mean of three independent experiments ± SD.

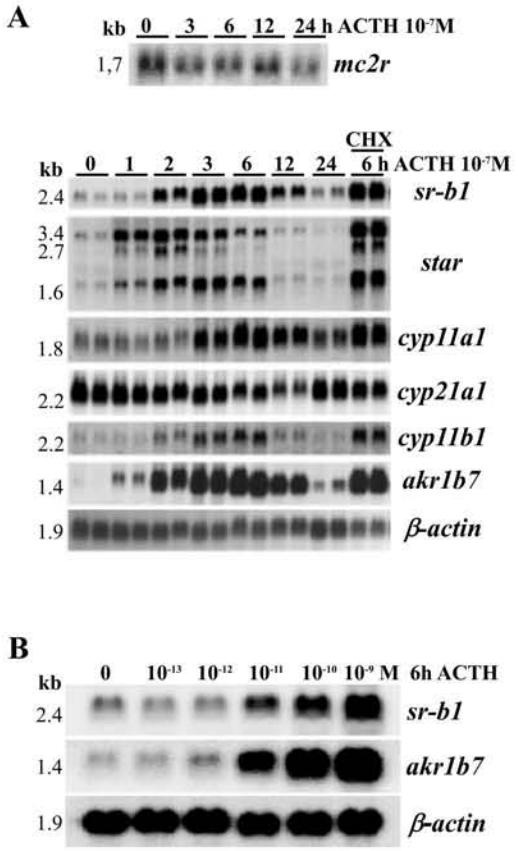


Figure 3
Effects of ACTH on steroidogenic genes expression in ATC1 line. **A**, Time course effects of ACTH on the expression of genes involved in ACTH response (*mc2r*), cholesterol transport (*sr-b1*, *star*), steroid conversion (*cyp11a1*, *cyp21a1*, *cyp11b1*) and detoxification (*akr1b7*). Cells were starved 24h in minimum medium (without serum) before the addition of ACTH (10^{-7}M) alone or in combination with cycloheximide (CHX, 10^{-5}M) for times indicated in figure. **B**, In order to determine the sensitivity of the response of steroidogenic genes, cells were incubated for 6h with increasing doses of ACTH. The northern blots were prepared with 25 mg of total RNA in each lane and transferred onto a nylon membrane, and the filters were successively hybridized with the indicated ^{32}P-labeled probes. The northern blots were repeated at least three times in independent experiments.

Table 1
ACTH-dependent changes in mRNA levels in ATC1 line after 3h and 6h induction with 10^{-7}M ACTH. Results were quantified from three independent northern blot experiments and expressed as fold-induction (↑x) or fold-inhibition (↓÷). Maximal effect was in bold number.

	3h	6h
sr-b1	↑x 22 ± 3	**↑x 39 ± 9**
***star* (3.4kb)**	**↑x 23 ± 8**	↑x 7.2 ± 3
***star* (1.6kb)**	↑x 18 ± 8.5	**↑x 20 ± 8**
cyp11a1	↑x 6.8 ± 1.2	**↑x 9.8 ± 2.1**
cyp11b1	↑x 2 ± 0.5	**↑x 2.4 ± 0.6**
akr1b7	↑x 78 ± 14	**↑x 196 ± 28**
sf-1	**↑x 2.9 ± 0.3**	↑x 2.2 ± 0.3
dax-1	↓÷ 1.8 ± 0.15	**↓÷ 11.7 ± 3**

Steroidogenic activity of the cell lines

Gas chromatography-mass spectrometry analysis of the serum-free media of the ATC1 line cultured for 30 h in presence of 10^{-7}M ACTH showed that the only steroid produced was corticosterone (Fig. 2A). A similar profile was observed in the absence of ACTH indicating that corticosterone was the main if not the only product of basal steroidogenesis in these cells (not shown). Corticosterone secretion was then assayed in the serum-free media of each cell line (Fig 2B and 2C). The basal level of corticosterone secretion varied among the cells from 12 ng $\pm$ 4 to 85 ng $\pm$ 9 /10^6 cells/6h for ATC1 and ATC7-L, respectively (fig. 2B). Importantly for both lines, a significant stimulation of corticosterone secretion was observed starting from 10^{-11}M ACTH and then increased in a dose-dependent manner, reaching the greatest values at 10^{-7}M ACTH. As a consequence of the differences in the corticosterone basal production, the greatest amount of stimulation (observed at 10^{-7}M ACTH) was 49-fold in ATC1 line and only 6.5-fold for the ATC7-L line. However, the two cell lines produced equivalent accumulated amounts of corticosterone in response to 10^{-7}M ACTH, 578 ng ± 38 and 554 ng ± 38 /10^6 cells/6h for ATC1 and ATC7-L, respectively. It is noteworthy that corticosterone production in ATC lines in the presence of 10^{-7}M ACTH (ATC1, 183 ± 43 ng/10^6 cells/2h; ATC7L, 255 ± 56 ng/10^6 cells/2h) was very similar to cortisol production induced by 10^{-8}M ACTH in primary culture of bovine adrenocortical cells, *i.e.* 127 ng/10^6 cells/2h (48). As shown in Fig. 2C, the two lines responded to 10^{-7}M ACTH with similar kinetics up to 6 h, doubling corticosterone secretion in 2-3 h but behaved differently thereafter : steroid production of ATC1 cells slowed down while that of ATC7-L went on rising until 12 h.

Effects of ACTH on steroidogenic genes expression in cell lines

To understand the patterns of steroid hormone synthesis in the ATC lines, we examined in detail the expression and hormonal responsiveness of the mRNAs for the genes involved in the different steps of the glucocorticoid synthesis *i.e.* ACTH response (*mc2r*), cholesterol transport (*sr-b1*, *star*), steroid conversion (*cyp11a1*, *cyp21a1*, *cyp11b1*) and detoxification of harmful by-products (*akr1b7*). As gene expression and hormonal sensitivity were equivalent between the two cell lines (data not shown), following experiments only focused on ATC1 cells. As shown in Fig. 3, all the mRNAs mentioned above were detected but differed in their response to ACTH. Indeed, *mc2r* and *cyp21a1* mRNAs were detected but were unresponsive to ACTH (Fig. 3A). By contrast, mRNAs levels for *sr-b1*, *star*, *cyp11a1*, *cyp11b1* and *akr1b7* were strongly induced in a time-dependent manner by ACTH treatment and these inductions were not abolished when the protein synthesis inhibitor, cycloheximide was added together with the hormone. In addition, incubation with actinomycin D prevented ACTH mediated induction of all these mRNAs (not shown). Thus the effect of ACTH on accumulation of these mRNAs is essentially transcriptional. Note that hormonal stimulation was transient as all responsive mRNAs returned to near control values after 24 h. Maximal mRNAs accumulation occurred after 3-6 h of ACTH treatment for most of the responsive genes and earlier, after 2-3 h, for *star*. Although *star* was clearly the earliest inducible gene, quantitative analyses of the northern blots signals pointed *akr1b7* and *sr-b1* genes as being the most responsive genes to ACTH (Table 1). Indeed, a 6h incubation of the cells with the hormone displayed a dose-dependent increase of *akr1b7* and *sr-b1* mRNAs levels which was detectable from 10^{-11}M ACTH (Fig. 3B).

Effect of ACTH on DAX-1 and SF-1 expression in cell lines

Since the transcription factors DAX-1 and SF-1 are known to respectively repress and activate adrenal steroidogenesis, we next examined whether they were expressed in

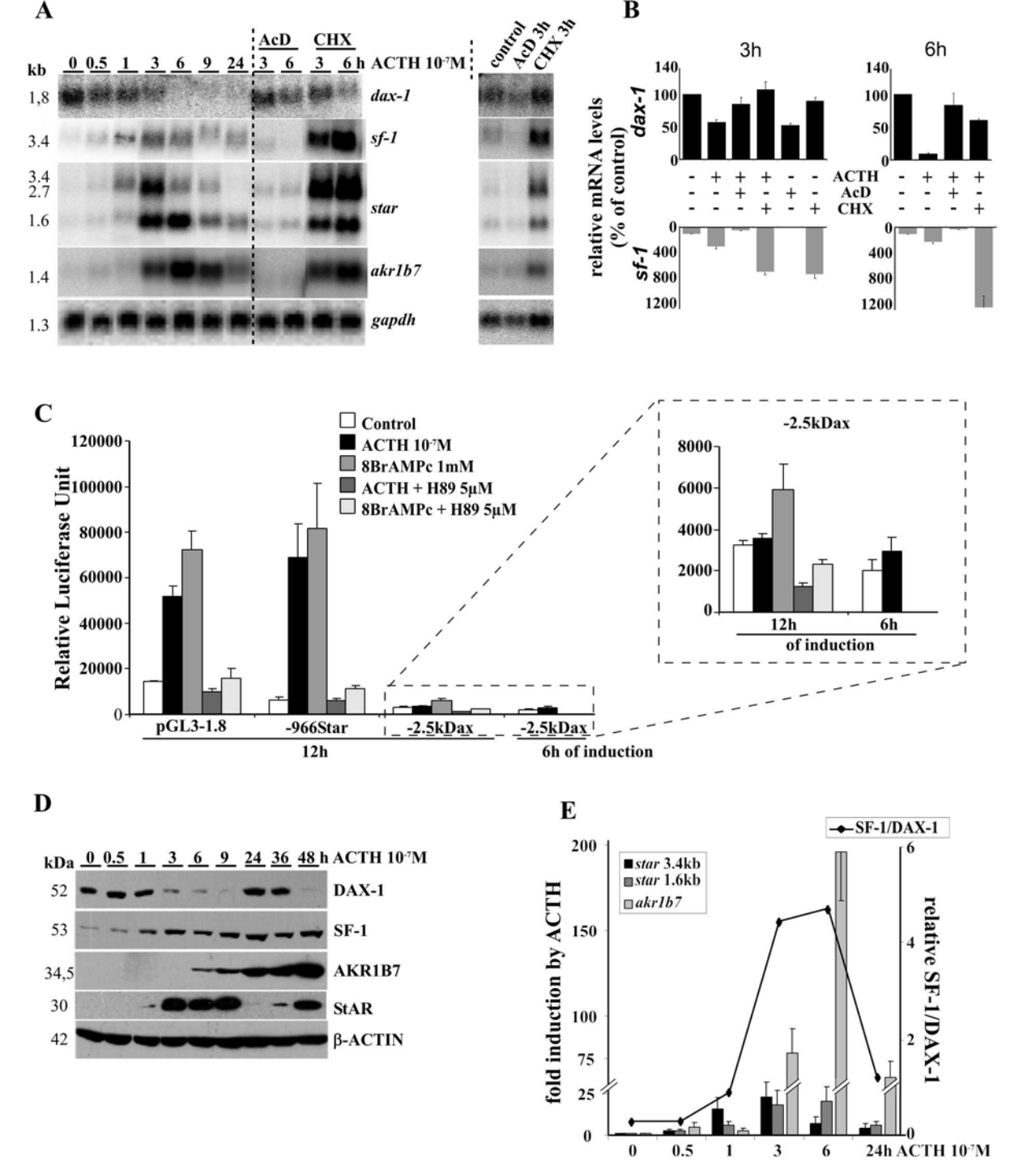


Figure 4

Regulation by ACTH of DAX-1 and SF-1 in ATC1 line. **A**, Comparison of *dax-1*, *sf-1*, *star* and *akr1b7* genes mRNA expression in ATC1 cells in response to increasing time induction with ACTH alone or in combination with actinomycin D or cycloheximide (left panel) or actinomycin D and cycloheximide alone (right panel) at 10^{-7}M, 1 µg/ml and 10^{-5}M, respectively. The northern blots were prepared with 25 µg of total RNA in each lane and transferred onto a nylon membrane, and the filter was sequentially hybridized with the indicated ^{32}P-labeled probes. **B**, Histograms representing the quantification of *dax-1* (black bar) and *sf-1* (grey bar) mRNA northern blot signals from three independent experiments using ATC1 cells treated for 3h (left part) and 6h (right part). **C**, In order to test the hormonal responsiveness of the murine promoters of *dax1*, *star* and *akr1b7* genes in ATC1 line, cells were transfected with the corresponding Luc reporter constructs and submitted to either ACTH or cAMP inductions in absence or presence of the PKA inhibitor H89. Results represent the mean of two or three independent experiments performed in triplicate. **D**, Western blot analysis of DAX-1, SF-1, StAR and AKR1B7 proteins accumulation in ATC1 cells in response to increasing time induction with ACTH. **E**, Comparison between *star* and *akr1b7* relative mRNA levels (histograms) and the relative ratio of DAX1/SF1 protein accumulation (line). Quantifications represent the mean of at least three independent experiments ± SD.

ATC lines and looked at their behaviour upon hormonal stimulation. ATC1 cells were treated with 10^{-7}M ACTH for increasing periods of time and the accumulation of the mRNAs and proteins for DAX-1 and SF-1 were correlated to expression of *star* and *akr1b7*, two known SF-1 target genes. To prevent ACTH decay in long-time incubation (24-48 h), media were replaced every 12 h by fresh media containing 10^{-7}M ACTH. As shown in Fig. 4A, ATC1 cells were positive for *dax-1* gene expression. Interestingly, ACTH induced a dramatic time-dependent decrease in *dax-1* mRNA levels which was clearly observed after 3 h reaching a maximum at 6 h (Table 1). By contrast, *sf-1* mRNA levels were significantly induced in the same conditions and maximal induction was reached in cells stimulated for 3 h with ACTH (Table 1). Corresponding kinetics of *star* and *akr1b7* mRNAs in response to ACTH are illustrated (Fig.4A). To further understand the mechanisms involved in the ACTH-dependent changes in gene expression, we followed *sf-1* and *dax-1* mRNA levels under conditions of transcription (actinomycin D) or protein synthesis (cycloheximide) blockade (Fig. 4A & B). As for *star* and *akr1b7* genes, the ACTH-dependent stimulation of *sf-1* mRNA was completely prevented by actinomycin D and was resistant to cycloheximide (Fig. 4A & B), suggesting a direct action of ACTH mainly at the transcriptional level. The ACTH-dependent decrease in *dax-1* mRNA observed after 3 or 6 h treatment was almost completely prevented by co-incubation with cycloheximide, indicating that at least one labile protein factor was required to repress the mRNA accumulation. When actinomycin D was applied alone, levels of *dax-1* mRNA decreased to 52% of the control value after 3 h indicating the approximate half-life of the mRNA. Addition of ACTH did not accelerate this decay rate but rather prevented it, maintaining near-control mRNA levels after 3 h (85.5 ± 9.8%) and even after 6 h of co-incubation (83.9 ± 18%). Altogether these data suggested that two possible and not mutually exclusive mechanisms could lead to the observed down-regulation of *dax-1* mRNA : 1) ACTH induction of the expression of a labile repressor protein blocks the transcription of the *dax-1* gene and/or 2) ACTH induction of a labile mRNA-destabilizing protein is responsible for *dax-1* mRNA decay. To elucidate these mechanisms, we conducted transient transfection assays in ATC1 cells to test the ability of murine *dax-1* promoter to mediate the repression of *luc* reporter construct upon ACTH treatment (Fig.4C). Control reporter constructs driven by the *akr1b7* gene 1.8-kb promoter (pGL3-1.8) or the *star* gene 0.9-kb promoter (-966Star) were both efficiently stimulated by either ACTH or 8Br-cAMP treatments and as expected, these stimulations were counteracted by H89, a PKA inhibitor. As illustrated in Fig.4C, the murine 2.5-kb *dax-1* promoter *luc* reporter construct (-2.5kDax) showed a detectable basal activity in ATC1 cells but was not repressed upon 6 h or 12 h of ACTH stimulation. Thus, ACTH-mediated *dax-1* repression is unlikely to be at transcriptional level.

We next examined whether 10^{-7}M ACTH applied for 0-9 h (at a single dose) or for a prolonged time, 24-48 h (with hormone replacement every 12 h), induced similar changes at DAX-1 and SF-1 protein levels. As shown in Fig. 4D, DAX-1 protein levels were significantly decreased in a time-dependent manner from 3 h and up to 9 h whereas SF-1 expression was increased by ACTH treatment and reached a plateau after 3 h. These kinetics were similar to those observed at the mRNA levels (Fig. 4A) and showed that during the 0-9 h period of hormonal treatment, ACTH-mediated changes in DAX-1 and SF-1 proteins occured mainly by controlling their mRNAs accumulation. Interestingly, a long-term hormonal exposure of the cells (24-48 h) induced a transient desensitization of the ACTH-mediated repression of DAX-1 expression and ACTH-mediated stimulation of StAR expression (Fig. 4D). Indeed, DAX-1 protein expression returned to initial levels by 24 h of ACTH treatment, began to

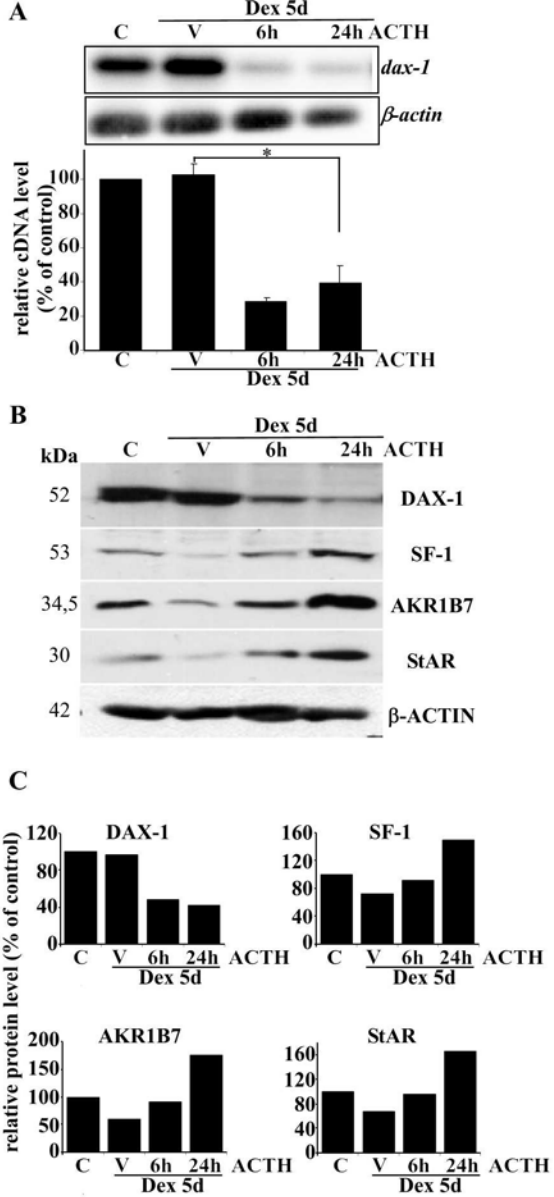


Figure 5

DAX-1 and SF-1 expression in adrenal is regulated by ACTH. In order to determine the effect of ACTH on *dax-1* and *sf-1* expression in vivo, mice were treated by dexamethasone alone or combination with ACTH (see experimental procedures). C, control, V, vehicle. **A**, RT-PCR analysis of relative *dax-1* mRNA levels *in vivo* in response to ACTH. Histograms represent the mean of three independent experiments ± SD. *, $p < 0.01$. cDNA level of control was set as one hundred percent. **B**, Comparison of SF-1, DAX-1, AKR1B7 and StAR proteins levels in mice treated with dexamathesone alone or combination with ACTH. **C**, Histograms represent the quantification of DAX-1, SF-1, AKR1B7 and StAR proteins from pooled adrenal glands of three animals per condition. The control condition protein levels were set as one hundred percent.

decrease again by 36 h and was fully repressed by 48 h. StAR protein levels followed an exact mirror pattern. The high accumulation of DAX-1 protein observed at 24 h without a concomitant rise in mRNA levels have also been observed in primary cultures of granulosa cells (49). This suggested that translational mechanisms might also participate in the regulation of DAX-1 expression upon sustained exposure to the hormone. Accumulation of both AKR1B7 and StAR proteins was correlated with low DAX-1 and high SF-1 contents found in ATC1 cells stimulated for 3-9 h with ACTH (Fig. 4D). However, there were clear differences between the AKR1B7 and StAR proteins kinetic responses to hormone stimulation : the former accumulated slowly probably because of delayed translation of its mRNAs whereas the latter reached immediately a plateau reflecting a concomitant increase in both transcription and translation. Thereafter (24-48 h) AKR1B7 went on accumulating regardless of DAX-1 levels whereas StAR protein expression remained inversely correlated to low DAX-1 expression. These observations are likely to reflect the differences in protein turn-over, AKR1B7 having a very long half-life (over 96 h, M. Manin, unpublished results) and StAR a short one (around 5 h, (50)). Because DAX-1 represses SF-1 target genes by regulating at least SF-1 transactivation (31), one might expect that the SF-1/DAX-1 protein ratio in each cell would be determinant for the fine tuning of gene transcription. As shown in Fig. 4E, the time-dependent changes in *star* and *akr1b7* mRNAs levels following ACTH treatment reflected a parallel change in the SF-1/DAX-1 protein ratio.

Altogether these results demonstrate that ATC1 cells (and also ATC7-L, not shown) have conserved both DAX-1 and SF-1 expression. Importantly, in these cells ACTH was shown to control the balance between repressor and inducer activities, by negatively regulating DAX-1 accumulation and stimulating SF-1 expression.

Effect of ACTH on DAX-1 and SF-1 expression *in vivo*

We next asked whether the ACTH-dependent regulation of DAX-1 and SF-1 expression observed in the cell lines might also occur *in vivo*. Therefore, we followed the changes in the expression of these two regulators in the adrenal glands of mice injected for 5 days with either dexamethasone alone to maintain a negative feed-back on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA) or in combination with long-acting ACTH (synacthene^{TM}) for increasing periods of time. As shown in Fig. 5A, semi-quantitative RT-PCR analyses showed that although HPA blockade caused no significant stimulation of *dax-1* mRNA levels, a drastic decrease was observed following ACTH treatment (over 70% ± 2.3 of the control value after 6 h). Importantly, similar results were obtained at the level of DAX-1 protein (Fig. 5B and 5C). As expected, SF-1, AKR1B7 and StAR proteins levels exhibited an opposite behaviour : they decreased upon dexamethasone treatment and were stronly re-induced following ACTH injections (Fig. 5B and 5C). We conclude that the ACTH-mediated opposite regulation of DAX-1 and SF-1 expression observed in the cultured cell lines was consistent with the *in vivo* data. Thus, it appears that *ex vivo* as well as *in vivo*, ACTH imposes changes in SF-1/DAX-1 ratio that are likely to participate to hormonal regulation of at least *akr1b7* and *star* genes expression.

Role of DAX-1 on SF-1 dependent *akr1b7* promoter activity

It is well established that SF-1 or cAMP-induced transactivation of the *star* gene is inhibited by DAX-1 (28, 30). The *akr1b7* gene 0.5-kb promoter (-510/+41) was previously shown to be stimulated by SF-1 in cell transfections studies, through the recruitment of three binding sites located at –503, -458 and –102 (19). In addition, we had shown that constitutive DAX-1 ectopic expression in Y-1 adrenocortical cells was able to abolish cAMP responsiveness of the *akr1b7* endogenous gene (18). Since our *ex*

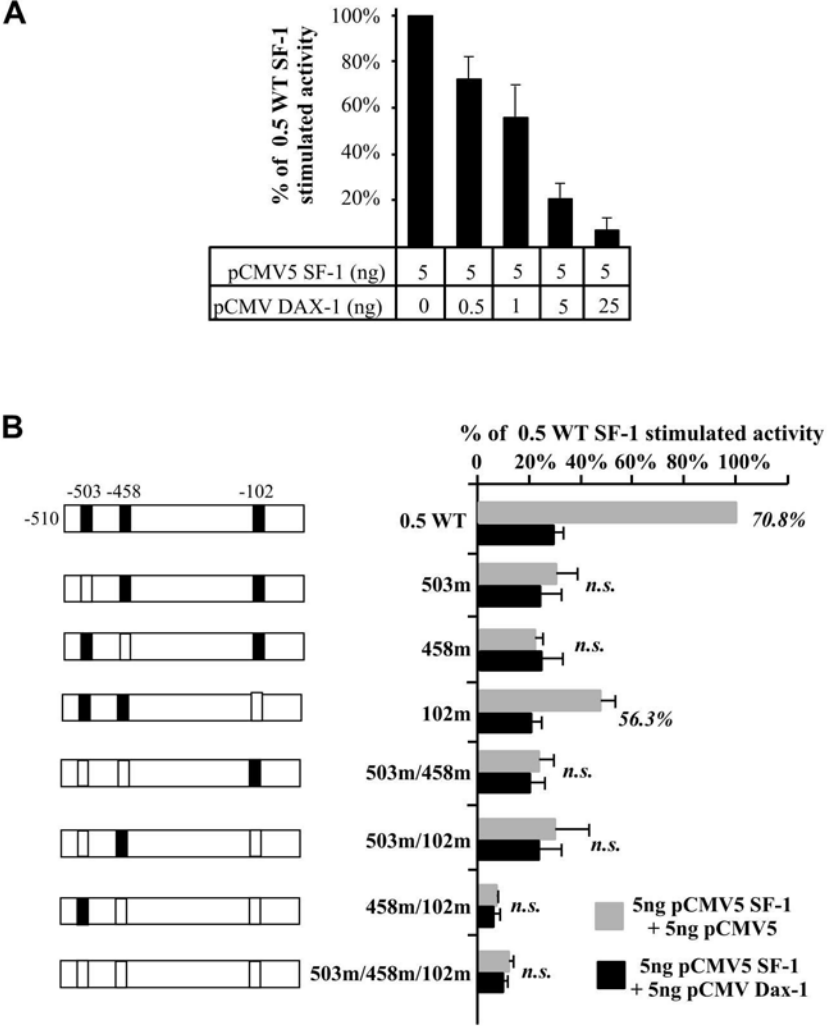


Figure 6

Role of DAX-1 on *akr1b7* gene promoter activity. **A**, DAX-1 repress *akr1b7* promoter activity. In order to test the ability of DAX-1 to repress SF-1-mediated *akr1b7* activity, HeLa cells were transfected with 1 µg of the 0.5 kb wild type promoter together with 5 ng of pCMV5-SF-1 expression vector and increasing doses of pCMV-DAX-1 expression vector that were normalized to the corresponding amounts of empty vector. Results represent the mean of two or three independent experiments performed in triplicate. SF-1 activated 0.5-kb wild type construct was set as one hundred percent. **B**, Single SFRE mutation impair DAX-1 repression. In order to assess the effect of mutations of the SFREs on DAX-1 repression in the context of 0.5-kb promoter, HeLa cells were transfected with 1µg of the mutant constructs, co-transfected with 5ng pCMV5-SF-1 and 5ng pCMV-DAX-1 (black bar) or the same amount of the corresponding empty vector (grey bar). Results represent the mean of the least three independent experiments performed in triplicate ± SD. The relative luciferase activity was normalized to the Renilla activity of a cotransfected expression vector. SF-1 activated 0.5 kb wild-type promoter activity was set as one hundred percent. DAX-1 repressive activity displayed on the right of the bars. n.s., there is no significant repression by DAX-1 ($p>0.05$).

vivo and *in vivo* data shows a clear correlation between SF-1/DAX-1 ratio and *akr1b7* expression, we thus asked whether the *akr1b7* gene transcription could also be regulated by SF-1/DAX-1 balance in transfected HeLa cells (Fig. 6A). DAX-1 overexpression led to a marked dose-dependent decrease in SF-1 stimulated promoter activity. This decrease was not observed when the cells were solely transfected with pCMV-DAX-1 (data not shown). This suggests that DAX-1 effect on *akr1b7* promoter activity was strictly dependent on SF-1 activity. As expected all the individual mutations previously shown to affect SF-1 responsiveness of the 0.5-kb promoter also affected DAX-1 repressive activity, although to a different degree (Fig. 6B). Indeed, the individual mutation of either the –503 or –458 sites abrogates DAX-1 repressive capacity whereas mutation of the –102 site only modestly alters it, a result consistent with its poor responsiveness to SF-1 in HeLa cells (19). Interestingly, combined mutations of the –458 or –503 sites were not more efficient than their individual mutations. This observation is reminiscent of early results from Hanley and colleagues who suggested that to be efficient, DAX-1-mediated repression of SF-1 target genes requires multiple SF-1 sites within the promoter region (27).

DISCUSSION

We undertook this study in an attempt to develop novel cell lines maintaining differentiated endocrine functions of ZF adrenocytes in order to investigate the mechanisms of steroidogenic genes regulation in response to the physiological activator of glucocorticoid synthesis, ACTH. Using genetically targeted oncogenesis, we have obtained the first immortalized cell lines, ATC1 and ATC7-L, that have retained a complete ZF phenotype. This phenotype was manifest at multiple levels : steroidogenic capacity, ACTH responsiveness and expression profile of specific genes. Indeed, cultured ATC lines only produced corticosterone either in basal condition or under ACTH stimulation, a feature characteristic of the normal mouse ZF cells. Both lines appeared equally sensitive to ACTH as significant stimulation of corticosterone biosynthesis could be recorded from 10^{-11}M, a dose similar to ACTH concentration in mouse plasma. At maximally effective concentrations, ACTH causes a 6.5- to 49-fold increase in corticosterone production over the basal levels in ATC7-L and ATC1 lines, respectively. As expected, both lines expressed the genes that support the initial steps of steroid biosynthesis (*mc2r*, *sr-b1*, *star*, *cyp11a1*, *akr1b7*) as well as the genes required for the final steps of corticosterone synthesis, *i.e.* the 21-hydroxylase (*cyp21a1*) and the ZF-specific enzyme 11β-hydroxylase (*cyp11b1*). In agreement with the high hormonal responsiveness of corticosterone production, most of these genes were strongly induced by ACTH. However, for unknown reasons and in contrast to the normal gland, *mc2r* (51, 52) and *cyp21a1* (53) genes were found unresponsive to ACTH but constitutively expressed. Currently available models of adrenocortical cell lines are almost exclusively represented by mouse Y-1 cells (54) and human NCI-H295 cells (40). Although both models have been extensively used and have proved their considerable value in studying regulatory mechanisms of adrenocortical steroidogenesis, these cells do not present most of the physiological features of the adrenal cortex (for review (55)). Indeed, although Y-1 line exhibits features of ZF cells they are defective in 21-hydroxylase activity because of *cis*-inactivation of the *cyp21a1* gene (37) and therefore does not synthesize corticosterone. In addition, propagation of this line over years in different laboratories, has led to spurious accumulation of unwanted variants, some of which became completely or partially resistant to ACTH. On the other hand, NCI-H295 cells exhibit simultaneous characteristics of both ZF and ZG cells: they produce cortisol and aldosterone but respond very poorly to ACTH reflecting the low

expression level of MC2R. Therefore, most if not all transfection experiments using Y-1 or NCI-H295 cells that were designed to examine the role of the cAMP-dependent pathway on transcriptional regulation were conducted with either forskolin (an activator of adenylate cyclase) or cAMP analogues instead of the physiological inducer, ACTH. It is noteworthy that we establish here, that ATC1 cells transfection is efficient and allows ACTH responsiveness of both *akr1b7* and *star* genes promoters. Up to now very few alternative models of adrenocortical cell culture have been described. Two of them were derived from tumors induced in transgenic mice by SV-40 large T-antigen targeted in the adrenal glands using either the *CYP11A1* (56, 57) or the *α-inhibin* (58, 59) promoter regions. More recently a third model was established from transgenic mice adrenals harboring a temperature-sensitive T-antigen under the control of an ubiquitously active promoter (60). However, none of these lines were reported to show ACTH-responsiveness or efficient corticosterone secretion. Although it is unclear why previous targeted oncogenesis attempts failed to produce differentiated immortalized cells, we can hypothesise that the choice of the *akr1b7* gene promoter to target the expression of the large T antigen of SV40 is of paramount importance (since this is the only major difference with previously reported experiments). Indeed, in order to generate differentiated tumors the T-ag has to provide a growth advantage to a cell population which is already committed to produce the desired steroids (*i.e.* glucocorticoids in our case). *Akr1b7* mRNA expression is first detected at embryonic day 13.5 (E13.5) (44), a stage occuring soon after the onset of corticosteroid biosynthesis at E12.5 (reviewed in (61)). By contrast, the *cyp11a1* gene, the earliest steroidogenic gene expressed in the adrenocortical anlage, is turned on from E11 (62, 63), before cells have acquired full steroidogenic capacity. This could explain why the cell lines derived from targeted adrenal tumors using the *CYP11A1* promoter, remain poorly differentiated and lose ACTH responsiveness by the fourth passage (56). On the other hand, the cell lines isolated from targeted tumors using the *α-inhibin* promoter were supposed to originate from the X zone of adrenal cortex which contains a cell population with a poorly differentiated steroidogenic phenotype (58). Thus by comparison with the available cell lines above cited and according to their steroidogenic activity, ATC lines appeared to be the best differentiated adrenocortical cell lines (64). Finally, reminiscent of their differentiated endocrine phenotype, several lines of evidence indicate that ATC lines are derived from differentiated tumors that have not achieved malignant transformation yet. Indeed, as in normal adult tissue the mRNAs for cyclin dependent kinase inhibitor $p57^{KIP2}$ (65) and transcription factor GATA-6 (66) were found highly expressed while markers associated with malignancy *i.e.* IGF2 (67, 68) and GATA-4 (69, 70) remained down regulated in ATC lines.

Although the activator SF-1 and the repressor DAX-1 are known to regulate common genetic cascades that ensure normal adrenal organogenesis and adult adrenocortical function (25), murine Y-1 cells, by far the most studied adrenocortical cell model, are devoid of DAX-1 (30). We focused our attention on the ability of the ATC lines to express these essential transcriptional regulators. ATC lines were found positive for the expression of both SF-1 and DAX-1. Moreover careful analysis of the impact of ACTH on gene expression allowed us to reveal mechanisms of hormonal regulation of steroidogenic activity that were until now, uncharacterized in ZF cells. First, ACTH influenced the cellular balance between SF-1 and DAX-1 expression levels by stimulating the former and repressing the latter at both the mRNA and protein levels. Second, ACTH-dependent changes in SF-1/DAX-1 proteins ratio are likely to fine tune the glucocorticoid response because they are accurately correlated to changes in mRNA levels of steroidogenic genes. Besides, these observations allowed the identification of a

novel DAX-1 target gene participating in detoxification of steroidogenesis byproducts, *i.e.* aldose reductase-like *akr1b7*. Finally, it is essential to stress that these observations were confirmed *in vivo* in the adrenals of mice subjected to HPA blockade and ACTH injections, demonstrating the physiological relevance of the ATC lines model.

Until now DAX-1 down-regulation has only been described in primary cultures of adrenal ZG, in ovarian granulosa cells and in MA-10 Leydig cell line following hormonal stimulation by angiotensin II or forskolin, FSH and LH, respectively (34, 36, 49). Although the precise mechanism underlying the down-regulation of DAX-1 expression by ACTH is not clear, our data supports the idea of a labile protein that would act at post-transcriptional level to accelerate *dax-1* mRNA decay. First, the similar kinetics of DAX-1 mRNA and protein down-regulation patterns indicates that ACTH mainly controls mRNA concentrations. Second, the cycloheximide sensitivity of ACTH-mediated down-regulation of *dax-1* mRNA levels, points out the involvement of at least one labile protein factor acting to prevent or to decrease accumulation of mRNA. Third, ACTH does not accelerate the decay rate of *dax-1* mRNA upon transcription blockade (actinomycin D treatment) but rather maintains mRNA levels to control values. This rules out the possibility that ACTH may enhance the translation of pre-existing messengers for a labile mRNA-destabilizing factor. However, these experiments can not distinguish between the possibilities that the hormone-induced labile protein either represses *dax-1* gene transcription or accelerates its mRNA degradation, because both mechanisms would require *de novo* synthesis of the mRNA encoding this protein and hence would be sensitive to actinomycin D blockade. Finally, cell transfection studies conducted in ATC1 line showed that the transcriptional activity of the 2.5-kb upstream region of *dax-1* gene promoter was not repressed by ACTH. Interestingly, an ACTH-regulated protein involved in VEGF mRNA-destabilization was recently described in bovine adrenocortical cells (11, 71). The idea that a similar protein could be involved in *dax-1* gene down-regulation in ZF cells should be investigated. Although our data are very similar to what was previously reported in bovine ZG cells (36) our interpretation diverges from Osman and colleagues' hypothesis favouring down-regulation of *dax-1* gene transcription that was not directly demonstrated in their experiments. However, it is still possible that transcriptional repression was not observed in our transfection assays because key *cis*-acting sequences lying more upstream from the 2.5-kb *dax-1* promoter are essential to ACTH-mediated repression. Interestingly, a 11-kb 5' regulatory region of the murine *dax-1* gene was shown not to be sufficient to direct adrenal expression in transgenic mice. This suggests that adrenal expression of *dax-1* requires yet uncharacterized far upstream (or downstream) sequences (72).

Upregulation of SF-1 in response to secretagogues has been observed in primary cultures of bovine adrenocortical cells (36, 73) and in human H295 cells (74) whereas its expression was unaffected by hormonal induction in gonadal cells (34, 49). Hormonal regulation of SF-1 remains a conflicting subject because SF-1 was initially considered as insensitive to hormones and/or to the cAMP pathway in Y-1 cells (20, 75) as well as in the rat adrenal cortex (76). Although reasons for SF-1 unresponsiveness in previous experiments conducted in Y-1 cells remain unclear, it could be reasonably accounted for by the high variability of Y-1 cells, as discussed above. In agreement with this proposal, recently, SF-1 expression was shown to be stimulated by ACTH/cAMP in Y-1 adrenocortical cells at both the mRNA and protein levels (77) and same results were also obtained in our laboratory (Aigueperse C, unpublished data). Although the persistent expression of SF-1 in adrenal cortex sections of hypophysectomized rats (76) pointed out the dispensable role of ACTH for SF-1 expression, it is reasonable to hypothesise that an immunohistochemical approach was not sensitive enough to detect

moderate quantitative variations. Indeed, the present study conducted in ATC lines and in mice subjected to hormonal manipulations allowed us to record a 2- to 3-fold increase in SF-1 mRNA or protein levels over basal levels. Importantly, the results reported by Lehmann and colleagues in Y-1 cells were in the same range (77). Thus, by comparison with steroidogenic genes, the moderate ACTH sensitiveness of SF-1 was probably unnoticed in previous *in vivo experiments* performed by Nomura and colleagues (76). Anyway, converging data obtained either *in vivo* in mice (present results), in bovine primary cultures (36) or in highly differentiated murine cell lines (present results) argues undoubtedly for an hormonal modulation of SF-1 and DAX-1 cellular contents in the adrenal cortex. This could have important physiological consequences considering the critical nature of both *sf-1*and *dax-1* gene dosage in development and adaptative response like stress (78). In ATC lines, ACTH treatment gave rise to a transient induction of mRNA levels of most steroidogenic genes (culminating at 2-6 h and returning to initial values after 24 h) and notably of *star* and *akr1b7* both of which are targets for SF-1 and DAX-1. This temporal pattern mirrors that of DAX-1 and suggests that the ratio of SF-1 and DAX-1 intracellular levels determines whether their target genes are activated or repressed. When SF-1/DAX-1 ratio in ZF cells is low (0-1 h or 12-24 h after ACTH induction), SF-1-DAX-1 complexes are supposed to outnumber SF-1 molecules. Steroidogenic genes are then repressed and corticosterone production remains basal or decreases. Conversely, when SF-1/DAX-1 ratio is high (3-9 h after ACTH induction), SF-1 molecules are supposed to outnumber SF-1-DAX-1 complexes. Steroidogenic genes are activated and corticosterone production increases. However, this mechanism is unlikely to be the only one ensuring that steroidogenic activity is responsive to ACTH. Indeed, although Y-1 cells are devoid of DAX-1, they are still responsive to hormonal or cAMP induction. In fact, other transcriptional factors such as CREB, C/EBPβ or Sp1 are known to participate to the cAMP/ACTH regulation of SF-1 target genes in adrenocortical cells (13). The control of SF-1 and DAX-1 levels might therefore be part of the molecular arsenal of ZF cells to fine tune ACTH responsiveness. Consistent with a direct role of these two regulators in hormonal responsiveness is the recent demonstration of a cAMP-dependent dissociation of DAX-1-SF-1 nuclear complexes that promotes SF-1 interactions with coactivators and subsequent activation of SF-1 target genes (79). Our data show that at least in adrenocortical cells, DAX-1 does not only carry out a tonic inhibition of SF-1 (25) but rather that both *sf-1* and *dax-1* gene dosage is a dynamic process under the control of ACTH. Thus, one can speculate that returning to high DAX-1 protein levels after prolonged ACTH stimulation may be part of an intracellular feed-back, limiting steroidogenic response over time. Interestingly, Y-1 cells that lack DAX-1, showed no transient hormonal stimulation of steroidogenic genes but exhibited an uninterrupted accumulation of *akr1b7* mRNA levels up to 24 h (19). Considering that mice lacking DAX-1 showed an increased adrenal responsiveness to ACTH (32) while haploinsufficient SF-1$^{+/-}$ mice were less responsive and displayed a lower response to stress (80), one can assume that the ability of ZF cells to induce a rebound of DAX-1 levels may provide a mechanism limiting the adrenal response to stress.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank Yves Communal for flow cytometry analysis (Laboratoire d'Immunologie, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France), Angélique De Haze for excellent technical assistance and Samuel Guyot for microinjection of the transgene. We thank Françoise Caira for the critical reading of the manuscript. We are also grateful to Christine Puchol and Sandrine Plantade for care of the transgenic mice.

REFERENCES

1.**Simpson ER, Waterman MR** 1988 Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. Annu Rev Physiol 50:427-40

2.**Quinn SJ, Williams GH** 1988 Regulation of aldosterone secretion. Annu Rev Physiol 50:409-26

3.**Domalik LJ, Chaplin DD, Kirkman MS, Wu RC, Liu WW, Howard TA, Seldin MF, Parker KL** 1991 Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. Mol Endocrinol 5:1853-61

4.**Miller WL** 1988 Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr Rev 9:295-318

5.**Rigotti A, Edelman ER, Seifert P, Iqbal SN, DeMattos RB, Temel RE, Krieger M, Williams DL** 1996 Regulation by adrenocorticotropic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. J Biol Chem 271:33545-9

6.**Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH** 1996 Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. J Clin Invest 98:984-95

7.**Stocco DM, Clark BJ** 1996 Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. Endocr Rev 17:221-44

8.**Sewer MB, Waterman MR** 2003 ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. Microsc Res Tech 61:300-7

9.**Lefrancois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, Berger M, Daoudal S, Tritsch D, Veyssiere G, Jean C** 1999 Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. J Biol Chem 274:32875-80

10.**Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, Veyssiere G, Bertagna X, Jean C, Martinez A** 2004 Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 89:3010-9

11.**Chinn AM, Ciais D, Bailly S, Chambaz E, LaMarre J, Feige JJ** 2002 Identification of two novel ACTH-responsive genes encoding manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) and the zinc finger protein TIS11b [tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)-inducible sequence 11b]. Mol Endocrinol 16:1417-27

12.**Luo X, Ikeda Y, Parker KL** 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell 77:481-90

13.**Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A** 2003 SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. Nucl Recept 1:8

14.**Waterman MR** 1994 Biochemical diversity of cAMP-dependent transcription of steroid hydroxylase genes in the adrenal cortex. J Biol Chem 269:27783-6

15.**Reinhart AJ, Williams SC, Stocco DM** 1999 Transcriptional regulation of the StAR gene. Mol Cell Endocrinol 151:161-9

16.**Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, Hobbs HH** 1997 Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. J Biol Chem 272:33068-76

17.**Lopez D, Sandhoff TW, McLean MP** 1999 Steroidogenic factor-1 mediates cyclic 3',5'-adenosine monophosphate regulation of the high density lipoprotein receptor. Endocrinology 140:3034-44

18.**Aigueperse C, Val P, Pacot C, Darne C, Lalli E, Sassone-Corsi P, Veyssiere G, Jean C, Martinez A** 2001 SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor

1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. Mol Endocrinol 15:93-111

19.**Val P, Aigueperse C, Ragazzon B, Veyssiere G, Lefrancois-Martinez AM, Martinez A** 2004 Adrenocorticotropin/3',5'-cyclic AMP-mediated transcription of the scavenger akr1-b7 gene in adrenocortical cells is dependent on three functionally distinct steroidogenic factor-1-responsive elements. Endocrinology 145:508-18

20.**Zhang P, Mellon SH** 1996 The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 regulates the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcriptional activation of rat cytochrome P450c17 (17 alpha-hydroxylase/c17-20 lyase). Mol Endocrinol 10:147-58

21.**Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA** 1999 Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. Mol Cell 3:521-6

22.**Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM** 2001 ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. J Biol Chem 276:34888-95

23.**Aesoy R, Mellgren G, Morohashi K, Lund J** 2002 Activation of cAMP-dependent protein kinase increases the protein level of steroidogenic factor-1. Endocrinology 143:295-303

24.**Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL** 2001 Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. Mol Cell Endocrinol 185:17-25

25.**Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP** 2005 Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. Endocrinology 146:1018-24

26.**Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai KT, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL** 1996 Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. Mol Endocrinol 10:1261-72

27.**Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL** 2001 Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. Mol Endocrinol 15:57-68

28.**Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P** 1997 DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. Nature 390:311-5

29.**Ito M, Yu R, Jameson JL** 1997 DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. Mol Cell Biol 17:1476-83

30.**Lalli E, Melner MH, Stocco DM, Sassone-Corsi P** 1998 DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. Endocrinology 139:4237-43

31.**Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J** 1998 Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. Mol Cell Biol 18:2949-56

32.**Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, Shah S, Jeffs B, Jameson JL, Hammer GD** 2002 Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. Endocrinology 143:665-73

33.**Tamai KT, Monaco L, Alastalo TP, Lalli E, Parvinen M, Sassone-Corsi P** 1996 Hormonal and developmental regulation of DAX-1 expression in Sertoli cells. Mol Endocrinol 10:1561-9

34.**Jo Y, Stocco DM** 2004 Regulation of steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein in R2C cells by DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene-1). Endocrinology 145:5629-37

35.**Song KH, Park YY, Park KC, Hong CY, Park JH, Shong M, Lee K, Choi HS** 2004 The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear

receptor Nur77 and represses its transactivation. Mol Endocrinol 18:1929-40
36.**Osman H, Murigande C, Nadakal A, Capponi AM** 2002 Repression of DAX-1 and induction of SF-1 expression. Two mechanisms contributing to the activation of aldosterone biosynthesis in adrenal glomerulosa cells. J Biol Chem 277:41259-67
37.**Szyf M, Milstone DS, Schimmer BP, Parker KL, Seidman JG** 1990 cis modification of the steroid 21-hydroxylase gene prevents its expression in the Y1 mouse adrenocortical tumor cell line. Mol Endocrinol 4:1144-52
38.**Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV** 1990 Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. Cancer Res 50:5488-96
39.**Staels B, Hum DW, Miller WL** 1993 Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. Mol Endocrinol 7:423-33
40.**Rainey WE, Bird IM, Mason JI** 1994 The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. Mol Cell Endocrinol 100:45-50
41.**Clark BJ, Pezzi V, Stocco DM, Rainey WE** 1995 The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K+ in H295R adrenocortical cells. Mol Cell Endocrinol 115:215-19
42.**Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Manin M, Guyot S, Jean-Faucher C, Veyssiere G, Kahn A, Jean C** 1999 5'-flanking and intragenic sequences confer androgenic and developmental regulation of mouse aldose reductase-like gene in vas deferens and adrenal in transgenic mice. Endocrinology 140:1338-48
43.**Martinez A, Val P, Sahut-Barnola I, Aigueperse C, Veyssiere G, Lefrancois-Martinez AM** 2003 Steroidogenic factor-1 controls the aldose reductase akr1b7 gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site. Endocrinology 144:2111-20
44.**Sahut-Barnola I, Lefrancois-Martinez AM, Jean C, Veyssiere G, Martinez A** 2000 Adrenal tumorigenesis targeted by the corticotropin-regulated promoter of the aldo-keto reductase AKR1B7 gene in transgenic mice. Endocr Res 26:885-98
45.**Liere P, Akwa Y, Weill-Engerer S, Eychenne B, Pianos A, Robel P, Sjovall J, Schumacher M, Baulieu EE** 2000 Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 739:301-12
46.**Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM** 1994 The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). J Biol Chem 269:28314-22
47.**Fabre S, Manin M, Pailhoux E, Veyssiere G, Jean C** 1994 Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase-like protein specific to the mouse vas deferens. J Biol Chem 269:5857-64
48.**Begeot M, Langlois D, Vilgrain I, Saez JM** 1987 Angiotensin II (A-II) steroidogenic refractoriness in Y-1 cells in the presence of A-II receptors negatively coupled to adenylate cyclase. Endocr Res 13:301-16
49.**Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Miyamoto K** 2003 Involvement of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein, steroidogenic factor 1, and Dax-1 in the regulation of gonadotropin-inducible ovarian transcription factor 1 gene expression by follicle-stimulating hormone in ovarian granulosa cells. Endocrinology 144:1920-30
50.**Granot Z, Geiss-Friedlander R, Melamed-Book N, Eimerl S, Timberg R, Weiss AM, Hales KH, Hales DB, Stocco DM, Orly J** 2003 Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of

unwanted proteins. Mol Endocrinol 17:2461-76
51.**Morita TM, Imai T, Murata Y, Kambe F, Funahashi H, Takagi H, Seo H** 1995 Adrenocorticotropic hormone (ACTH) increases the expression of its own receptor gene. Endocr J 42:475-80
52.**Kijima H, Kubo M, Shimizu C, Ishizuka T, Takano K, Nagai S, Koike T** 2004 Effects of hypophysectomy and in vivo administration of ACTH or dexamethasone on the level of ACTH receptor mRNA in adrenal glands and adipose tissues of mice. Endocr Regul 38:87-95
53.**Imai T, Seo H, Murata Y, Ohno M, Satoh Y, Funahashi H, Takagi H, Matsui N** 1990 Alteration in the expression of genes for cholesterol side-chain cleavage enzyme and 21-hydroxylase by hypophysectomy and ACTH administration in the rat adrenal. J Mol Endocrinol 4:239-45
54.**Schimmer BP** 1979 Adrenocortical Y1 cells. Methods Enzymol 58:570-4
55.**Rainey WE, Saner K, Schimmer BP** 2004 Adrenocortical cell lines. Mol Cell Endocrinol 228:23-38
56.**Mellon SH, Miller WL, Bair SR, Moore CC, Vigne JL, Weiner RI** 1994 Steroidogenic adrenocortical cell lines produced by genetically targeted tumorigenesis in transgenic mice. Mol Endocrinol 8:97-108
57.**Compagnone NA, Bair SR, Mellon SH** 1997 Characterization of adrenocortical cell lines produced by genetically targeted tumorigenesis in transgenic mice. Steroids 62:238-43
58.**Kananen K, Markkula M, Mikola M, Rainio EM, McNeilly A, Huhtaniemi I** 1996 Gonadectomy permits adrenocortical tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene: evidence for negative autoregulation of the inhibin alpha-subunit gene. Mol Endocrinol 10:1667-77
59.**Rilianawati, Paukku T, Kero J, Zhang FP, Rahman N, Kananen K, Huhtaniemi I** 1998 Direct luteinizing hormone action triggers adrenocortical tumorigenesis in castrated mice transgenic for the murine inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene. Mol Endocrinol 12:801-9
60.**Mukai K, Nagasawa H, Agake-Suzuki R, Mitani F, Totani K, Yanai N, Obinata M, Suematsu M, Ishimura Y** 2002 Conditionally immortalized adrenocortical cell lines at undifferentiated states exhibit inducible expression of glucocorticoid-synthesizing genes. Eur J Biochem 269:69-81
61.**Keeney DS, Jenkins CM, Waterman MR** 1995 Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo. Endocrinology 136:4872-9
62.**Rogler LE, Pintar JE** 1993 Expression of the P450 side-chain cleavage and adrenodoxin genes begins during early stages of adrenal cortex development. Mol Endocrinol 7:453-61
63.**Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL** 1994 Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. Mol Endocrinol 8:654-62
64.**Ragazzon B, Lefrancois-Martinez AM, Val P, Tournaire C, Berger M, Gachancard-Bouya JL, Begue RJ, Veyssiere G, Martinez A** 2004 ACTH and PRL sensitivity of highly differentiated cell lines obtained by adrenocortical targeted oncogenesis. Endocr Res 30:945-50
65.**Liu J, Kahri AI, Heikkila P, Voutilainen R** 1997 Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells. J Clin Endocrinol Metab 82:1766-71
66.**Rahman NA, Kiiveri S, Rivero-Muller A, Levallet J, Vierre S, Kero J, Wilson DB, Heikinheimo M, Huhtaniemi I** 2004 Adrenocortical tumorigenesis in transgenic mice expressing the inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen transgene: relationship between ectopic expression of luteinizing hormone receptor and transcription factor GATA-4. Mol Endocrinol 18:2553-69

67.**Boulle N, Logie A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y** 1998 Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 83:1713-20
68.**Bourcigaux N, Gaston V, Logie A, Bertagna X, Le Bouc Y, Gicquel C** 2000 High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 85:322-30
69.**Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, Narita N, Wilson DB, Voutilainen R, Heikinheimo M** 2002 Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue. Endocrinology 143:3136-43
70.**Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonca BB, Lin CJ** 2004 Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. BMC Endocr Disord 4:3
71.**Ciais D, Cherradi N, Bailly S, Grenier E, Berra E, Pouyssegur J, Lamarre J, Feige JJ** 2004 Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. Oncogene 23:8673-80
72.**Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R** 1998 Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. Nature 391:761-7
73.**Enyeart JJ, Boyd RT, Enyeart JA** 1996 ACTH and AII differentially stimulate steroid hormone orphan receptor mRNAs in adrenal cortical cells. Mol Cell Endocrinol 124:97-110
74.**Kelly SN, McKenna TJ, Young LS** 2004 Modulation of steroidogenic enzymes by orphan nuclear transcriptional regulation may control diverse production of cortisol and androgens in the human adrenal. J Endocrinol 181:355-65
75.**Parker KL, Schimmer BP** 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. Endocr Rev 18:361-77
76.**Nomura M, Kawabe K, Matsushita S, Oka S, Hatano O, Harada N, Nawata H, Morohashi K** 1998 Adrenocortical and gonadal expression of the mammalian Ftz-F1 gene encoding Ad4BP/SF-1 is independent of pituitary control. J Biochem (Tokyo) 124:217-24
77.**Lehmann TP, Biernacka-Lukanty JM, Saraco N, Langlois D, Li JY, Trzeciak WH** 2005 Temporal pattern of the induction of SF-1 gene expression by the signal transduction pathway involving 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. Acta Biochim Pol 52:485-91
78.**Iyer AK, McCabe ER** 2004 Molecular mechanisms of DAX1 action. Mol Genet Metab 83:60-73
79.**Fan W, Yanase T, Wu Y, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H** 2004 Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. Mol Endocrinol 18:127-41
80.**Bland ML, Jamieson CA, Akana SF, Bornstein SR, Eisenhofer G, Dallman MF, Ingraham HA** 2000 Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. Proc Natl Acad Sci U S A 97:14488-93

II.B. ARTICLE 2

ENDOCRINE RESEARCH
Vol. 30, No. 4, pp. 945–950, 2004

ACTH and PRL Sensitivity of Highly Differentiated Cell Lines Obtained by Adrenocortical Targeted Oncogenesis

B. Ragazzon, A.-M. Lefrançois-Martinez, P. Val, C. Tournaire, M. Berger, J.-L. Gachancard-Bouya, R.-J. Bègue, G. Veyssière, and A. Martinez*

UMR6547 CNRS-Université Clermont II GEEM, Aubière, France

ABSTRACT

We established cell lines from adrenal tumors of transgenic mice harboring the large T-antigen of simian virus 40 under the control of the adrenocortical specific promoter of the scavenger aldose reductase-like *akr1b7* gene. Mass spectrometry analyses of serum-supplemented or serum-free culture media showed that ATC1 line secreted only corticosterone. These cells, propagated over 25 passages, were characterized with regard to ACTH and PRL responsiveness, as measured by increased corticosterone production, induction of genes involved in the different steps of steroidogenesis (cholesterol delivery, steroid biosynthesis and detoxification of by-products) and expression of transcriptional regulators (SF-1 and DAX1). Corticosterone secretion (RIA) in serum-free medium was stimulated over 12-fold after 6 h treatment with either 10^{-9}M ACTH or PRL and both hormones seemed equivalent in promoting this secretion (149 ± 14 ng and 145 ± 18 ng/10^6 cells/6 h, respectively). As expected, Northern blots indicate that ATC1 cells expressed mRNAs for the enzymes of corticosterone metabolism CYP11B1 and CYP21A, as well as those for the proteins SIK, SRB1, StAR, CYP11A1, and AKR1B7. Interestingly, these cells have maintained not only the expression of SF-1 but also that of DAX1. No expression of the zona glomeruloza-specific *cyp11b2* gene was detected. With the exception of *cyp21a* and *mc2r* genes which were constitutively expressed, most of the genes above

*Correspondence: A. Martinez, UMR6547 CNRS-Université Clermont II GEEM, 24 av des Landais, Aubière 63177, France.

DOI: 10.1081/ERC-200044168
0743-5800 (Print); 1532-4206 (Online)
Copyright © 2004 by Marcel Dekker, Inc.
www.dekker.com

mentioned were induced in a time- and dose-dependent fashion in response to ACTH or PRL while *DAX1* was repressed. Importantly, hormone-mediated repression of *DAX1* gene expression was also observed in vivo in mice adrenals. Altogether these data demonstrate that ATC1 line provided an unique model of well differentiated zona fasciculata immortalized cells suitable for the dissection of molecular events leading to ACTH and PRL regulation of adrenal functions.

Key Words: ACTH; PRL; Aldo-keto reductase; SF-1; DAX1; Targeted oncogenesis.

INTRODUCTION

The gene for AKR1B7 (aldo-keto reductase 1B7) encodes a murine aldose reductase-like protein involved in the detoxification of steroidogenesis by-products and thus is supposed to play an important role in maintaining homeostasis of adrenal cortex function (1). Accordingly *akr1b7* gene and its functional counterpart in human species *AKR1B1* were shown to be regulated in a coordinate fashion with steroidogenic genes by ACTH/cAMP (2). *Akr1b7* gene regulatory regions have been extensively analyzed in vitro and in vivo. This gene is a target for SF-1 and DAX1 factors and a −510/+41 promoter fragment is able to recapitulate temporal, zona fasciculata (ZF) expression and ACTH responsiveness in transgenic mice (3–6).

Although ACTH is generally considered to play a major role in the regulation of adrenal glucocorticoid secretion, several reports have suggested that other pituitary hormones (e.g., prolactin) also play a significant role in the regulation of adrenal function. Because exploring these homonal interplays would require alternative cell culture models we took advantage of the *akr1b7* 0.5 kb promoter to target the expression of the SV40 large T-antigen in the adrenal cortex of transgenic mice (7). Cell lines were derived from the adrenocortical tumors and herein, one of these lines (ATC1) was characterized regarding its ACTH and PRL responsiveness at the level of steroid secretion and gene expression.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic animals and culture conditions of adrenocortical cells were previously described (7). Gas–liquid chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analyses of steroids secreted in culture media were done as previously described (8). RIA of corticosterone was performed on culture media using ICN Biomedical corticosterone 3H RIA kit according to the manufacturer instructions. Adult male mice of the swiss strain CD1 (Charles River) were injected with vehicle, dexamethasone or ACTH (Synacthene) as described (4).

RESULTS

ATC lines were derived from cortical tumors obtained by targeting adrenal expression of the SV40 large T-antigen in transgenic mice using the −510/+41

Figure 1. Transgene contruct used in adrenal targeted ongenesis experiments.

promoter and intronic sequences of the *akr1b7* gene (Fig. 1). Two lines, ATC1 and ATC7G, established from two different founder mice (7), were amplified over 25 passages. Immunohistochemical analyses revealed that both contained an homogeneous cell population negative for aldosterone synthase (*cyp11b2* gene) and expressing AKR1B7 in response to 10^{-7}M ACTH.

Although both lines were very similar in terms of steroidogenic activity, hormonal sensitivity and gene expression patterns, here we will focus on the ATC1 line. Gas–liquid chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analyses of steroids released in the media of ATC1 cells cultured for 30 h in presence or absence of 10^{-7}M ACTH showed that corticosterone was the main if not the only steroid secreted. ATC1 cells were incubated for 6 h with increasing doses of ACTH or PRL and the corticosterone secretion in the media was quantified by RIA. Both ACTH and PRL induced a dose-dependent increase in corticosterone secretion. ACTH induced a 5-fold corticosterone increase over basal value since 10^{-11}M. As shown in Fig. 2, although ACTH appeared more efficient than PRL at the dose of 10^{-7}M, both hormones seemed equivalent in promoting this secretion when used at 10^{-9}M (149 ± 14 ng and 145 ± 18 ng/10^6 cells/ 6 h, respectively). The expression of genes involved in the different steps of steroidogenesis (Table 1) (cholesterol delivery, steroid biosynthesis, and by-products detoxification) and of those encoding transcriptional regulators participating in endocrine homeostasis (SF-1 and DAX1) was then analyzed by northern or western blots regarding basal levels and sensitiveness to 10^{-7}M ACTH or PRL. With the exception of *mc2r* and *cyp21a* which were constitutively expressed, all the other steroidogenic genes were highly inducible by either ACTH or PRL. Induction factors of

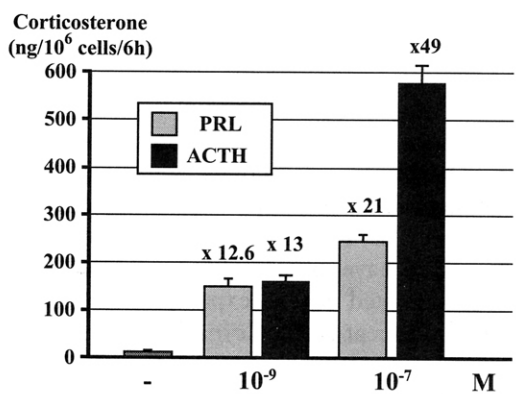


Figure 2. Comparison of ACTH- and PRL-mediated secretion of corticosterone by ATC1 cells. Corticosterone concentrations in the culture media were determined by RIA.

Table 1. Origin, molecular characteristics, and steroidogenic activity of the different models of immortalized adrenocortical cell lines.

	Spontaneous tumors		Targeted oncogenesis		
	H295	Y1	Cα1	ST5	ATC
Promoter			*α-inh*	*CYP11A1*	*akr1b7*
ACTH sensitiveness	+/−	+/−	?	—	+
Regulator genes	*SF-1*	*sf-1*	?	*sf-1*	*sf-1*
	DAX1	—	?		*dax1*
Steroidogenic genes	*MC2R*	*mc2r*	?		*mc2r*
	?	*sr-bl*	*sr-bl*	?	*sr-b1*
	StAR	*Star*	*Star*	*Star*	*Star*
	CYP11A1	*cyp11a1*	*cyp11a1*	*cyp11a1*	*cyp11a1*
	HSD3B2	*hsd3b2*	*hsd3b2*	*hsd3b2*	*hsd3b2*
	CYP21 A2		?		*cyp21 a1*
	CYP11B1	*cyp11b1*	*cyp11b1*	*cyp11b1*	*cyp11b1*
	CYP11B2	*cyp11b2*	?		
	AKR1B1	*akr1b7*		*akr1b7*	*akr1b7*
Steroid secretion	Aldosterone		Progesterone	Progesterone	
	Cortisol	Progesterone	Estradiol		Corticosterone
	Androgens		Corticosterone		
	Estrogens				

mRNA accumulation ranged from 8-fold (*cyp11a1*) up to 100-fold for the most sensitive gene (*akr1b7*). Notably, ATC1 cells expressed both SF-1 and DAX1 transcription factors whose mRNA steady state levels were found induced (over 2.5-fold) and repressed (8- to 11-fold) by both hormones, respectively. Importantly, ACTH-dependent induction of SF-1 and repression of DAX1 was also confirmed *in vivo* by comparing the western blot signals detected in adrenal extracts from control mice or mice treated with dexamethasone supplemented or not with ACTH injections for increasing period of time.

DISCUSSION

We describe here the steroidogenic activity and molecular characterization of a novel adrenocortical immortalized cell line displaying all the essential features of highly differentiated ZF cells. Previous studies on regulatory mechanisms of adrenocortical steroidogenesis have often utilized mouse Y1 (9) and human NCI-H295 (10) cells. Y1 cells exhibited general expression patterns of steroidogenic genes analogous to those of the ZF except that the *cyp21 a1* gene was not expressed and that the ZG specific marker, the *cyp11b2* gene, was expressed although at low levels (11). As a consequence these cells were unable to synthesize corticosterone. On the other hand, NCI–H295 cells have been reported to exhibit simultaneously the phenotypes of both zones producing cortisol and aldosterone and responding to both ACTH

and angiotensine II. Up to now three alternative cell culture models have been described. Two of them were derived from tumors induced in transgenic mice by SV-40 large T-antigen targeted in the adrenal glands by the *α-inhibin* (12) or the *CYP11A1* (13) promoter regions (Table 1). More recently a third model was established from transgenic mice adrenals harboring a temperature-sensitive T-antigen under the control of an ubiquitously active promoter (14). However, none of these lines were reported to show ACTH responsiveness or efficient corticosterone secretion. Based on our data from analysis for expression of the zonal markers (*cyp11b1, cyp11b2, akr1b7*), ACTH responsiveness and corticosterone secretion, ATC1 cells displayed the feature of pure *zona fasciculata* cells. In addition, unlike Y1 cells but as cells of the adrenal cortex, ATC1 line expressed the transcriptional suppressor DAX1 and we established that this nuclear factor was suppressed by ACTH treatment. The hormone-dependent DAX1 suppression observed in these immortalized cells is likely to be physiologically relevant because we have demonstrated it also occured *in vivo* in the mouse adrenal glands. Thus, this provides the first evidence that DAX1 may play a coordinating role over the adrenal steroidogenic pathway. Finally, using these cells, we have demonstrated that PRL was able to directly stimulate corticosterone release through the regulation of all the genes shown to be also ACTH sensitive. Although this observation should be confirmed *in vivo*, this is the first evidence for PRL acting directly on the genes involved in the adrenal steroidogenesis. To our knowledge, ATC1 line should be an unique model for dissecting the molecular mechanisms of the hormonal interplays regulating the steroidogenic pathway in *zona fasciculata*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Blaise Pascal Clermont II, and by grant 4471 from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCES

1. Lefrançois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, Berger M, Daoudal S, Tritsch D, Veyssiere G, Jean C. J Biol Chem 1999; 274:32875–32880.
2. Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, Veyssiere G, Bertagna X, Jean C, Martinez A. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3010–3019.
3. Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Manin M, Guyot S, Jean-Faucher C, Veyssiere G, Kahn A, Jean C. Endocrinology 1999; 140:1338–1348.
4. Aigueperse C, Val P, Pacot C, Darne C, Lalli E, Sassone-Corsi P, Veyssiere G, Jean C, Martinez A. Mol Endocrinol 2001; 15:93–111.
5. Martinez A, Val P, Sahut-Barnola I, Aigueperse C, Veyssiere G, Lefrancois-Martinez AM. Endocrinology 2003; 144:2111–2120.
6. Val P, Aigueperse C, Ragazzon B, Veyssiere G, Lefrancois-Martinez AM, Martinez A. Endocrinology 2004; 145:508–518.

7. Sahut-Barnola I, Lefrancois-Martinez AM, Jean C, Veyssiere G, Martinez A. Endocrine Res 2000; 26:885–898.
8. Gachancard-Bouya JL, Begue RJ. J Steroid Biochem Mol Biol 1994; 49:213–226.
9. Schimmer BP. Adrenocortical Y1 cells. Methods Enzymol 1979; 182:570–574.
10. Rainey WE, Bird IM, Mason JI. Mol Cell Endocrinol 1994; 100:45–50.
11. Domalik LJ, Chaplin DD, Kirkman MS, Wu RC, Liu WW, Howard TA, Seldin MF, Parker KL. Mol Endocrinol 1991; 5:1853–1861.
12. Rilianawati, Paukku T, Kero J, Zhang FP, Rahman N, Kananen K, Huhtaniemi I. Mol Endocrinol 1998; 12:801–809.
13. Mellon SH, Miller WL, Bair SR, Moore CC, Vigne JL, Weiner RI. Mol Endocrinol 1994; 8:97–108.
14. Mukai K, Nagasawa H, Agake-Suzuki R, Mitani F, Totani K, Yanai N, Obinata M, Suematsu M, Ishimura Y. Eur J Biochem 2002; 269:69–81.

Figures complémentaires à l'article

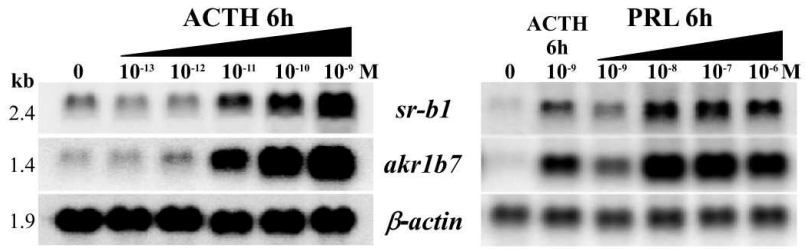
ACTH and PRL sensitivity of highly differentiated cell lines obtained by adrenocortical targeted oncogenesis.

Ragazzon B, Lefrancois-Martinez AM, Val P, Tournaire C, Berger M, Gachancard-Bouya JL, Begue RJ, Veyssiere G, Martinez A.

Endocr Res. 2004 Nov;30(4):945-50

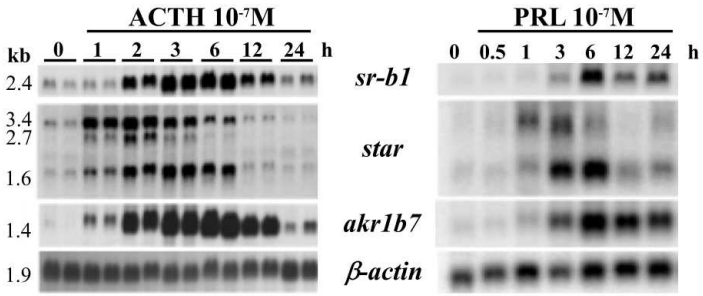
Comparatif des effets de l'ACTH et de la PRL sur les gènes impliqués dans la stéroïdogenèse dans les cellules ATC1

Sensibilité hormonale de l'expression des gènes



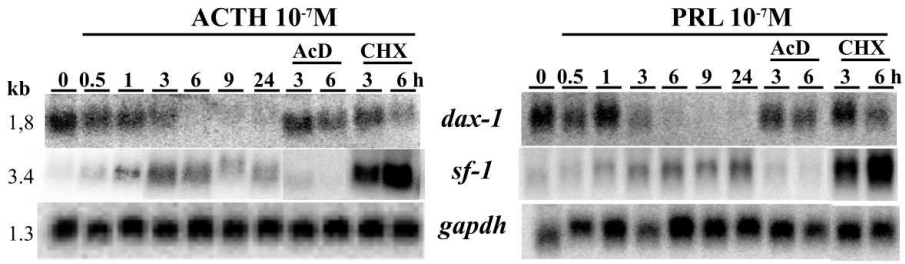
northern blot

Cinétique d'expression des gènes de la stéroïdogenèse



northern blot

Cinétique d'expression de *dax-1* et de *sf-1*



northern blot

AcD = actinomycine D 1µg/ml
CHX= cycloheximide 10^{-5}M

Tableau comparatif de la réponse des gènes à l'ACTH et la PRL

	ACTH 10^{-7}M		PRL 10^{-7}M	
	3h	6h	3h	6h
sr-b1		x 39 ± 9		x 11.5 ± 3.5
star (3.4kb)	x 23 ± 8		x 18± 9	
akr1b7		x 196 ± 28		x 98 ± 23
sf-1	x 2.9 ± 0.3		x 2.7 ± 0.4	
dax-1		: 11,7 ± 3		: 8.5 ± 0.2

Les chiffres représentent les inductions (x) ou les repressions (:) maximales obtenus après quantification des signaux de northern-blot de 3 expériences indépendantes à l'aide d'un Phosphoimager.

III. Discussion

Les cellules ATC présentent un phénotype stable de cellules de la zone fasciculée.

Plusieurs arguments permettent d'établir que les lignées ATC1 et ATC7-L présentent un phénotype de cellules de la zone fasciculée. 1) Ces cellules produisent un seul type de stéroïde, celui caractéristique de cette zone chez les rongeur : la corticostérone. 2) Elles expriment tous les gènes participant à la chaîne de biosynthèse des stéroïdes, ceux impliqués dans la réponse à l'ACTH (*mc2r*), le transport du cholestérol (*sr-b1* et *star*), sa transformation en corticostérone (*cyp11a1*, *cyp21a1* et *cyp11b1*) et dans la détoxication des produits secondaires comme l'isocaproaldéhyde (*akr1b7*). 3) Elles expriment le marqueur spécifique de la zone fasciculée : *cyp11b1* et pas celui de la zone glomérulée (*cyp11b2*). 4) Elles expriment les gènes codant les facteurs transcriptionnels connus pour être impliqués dans l'activation (*sf-1*) et dans la répression (*dax-1*) de la stéroïdogenèse. 5) Enfin, elles ont conservé le contrôle par l'ACTH de la production de corticostérone et de l'expression des gènes de la stéroïdogenèse.

Les productions de corticostérone basale ou sous stimulation ACTH des cellules ATC sont comparables à celles de cultures primaires de cellules cortico-surrénaliennes bovines. De plus, la réponse à l'ACTH des gènes et de la stéroïdogenèse est détectable dans une gamme de concentrations (10^{-11}M) similaires aux concentrations physiologiques ($0{,}5.10^{-12}$M). D'autre part, les cellules ATC expriment des marqueurs associés au phénotype différencié des cellules cortico-surrénalienne (*p57*^{kip2} et *gata-6*) et n'expriment pas les marqueurs de malignité *igf2* et *gata-4*. Enfin, leur phénotype est stable puisque ces caractéristiques différenciées sont conservées après un grand nombre de passages (plus de 25).

Fonctions différenciées perdues par les cellules ATC.

Ces pertes de fonctions ne correspondent pas à des pertes d'expression d'acteurs clés de la stéroïdogenèse, mais à l'expression constitutive de 2 gènes, *mc2r et cyp21a1*. Les causes de cette absence de régulation sont inconnues. L'extinction du gène *cyp21a1* dans les cellules Y1 a été corrélé à la forte méthylation *de novo* de ses régions régulatrices (Szyf *et al.*, 1990). Dans les lignées ATC la situation est inversée puisque le gène est fortement exprimé mais il est insensible à l'ACTH. De ce fait, il serait intéressant d'analyser son profil de méthylation afin d'établir des corrélations éventuelles entre son expression constitutive et des modifications épigénétiques.

Pourquoi la stratégie d'oncogenèse ciblée utilisant les séquences régulatrices du gène *akr1b7* pour diriger l'expression de l'AgT a-t-elle fonctionnée ?

Précédemment, l'utilisation des régions régulatrices du gène *CYP11A1* dirigeant l'expression de l'AgT avait permis d'obtenir des lignées cellulaires cortico-surrénaliennes peu différenciées : absence d'expression du gène *cyp21a1* et de réponse à l'ACTH (Mellon *et al.*, 1994). Compte tenu de l'utilisation d'un même oncogène, une des raisons possibles du caractère différencié des cellules ATC pourrait résider dans la différence des expressions embryonnaires des gènes *cyp11a1* et *akr1b7*. En effet, les ARNm *cyp11a1* sont détectés plus précocement, aux alentours de E11 (Ikeda *et al.*, 1994) contre E13,5 pour *akr1b7* (Sahut-Barnola *et al.*, 2000): soit dans le premier cas, au moment de la séparation des ébauches gonadiques et cortico-surrénaliennes mais avant que les cellules ne commencent à produire de la corticostérone (E12,5) et dans le deuxième cas après l'individualisation des ébauches et au moment où les cellules ont une stéroïdogenèse active. Si l'activité des promoteurs utilisés reflète l'expression de leur gène correspondant, on peut donc s'attendre à ce que l'oncogène AgT soit exprimé sous le contrôle des séquences *akr1b7* à un moment où les cellules se sont engagées dans une voie plus avancée de différenciation cortico-surrénalienne. Enfin, l'expression de *akr1b7* est spécifique de la zone fasciculée alors que le gène *cyp11a1* est exprimé dans tout le cortex. Une expression plus tardive et ciblée au niveau de la zone fasciculée de l'oncogène est donc probablement une des raisons expliquant la meilleure différenciation des lignées cellulaires ATC.

Rôle essentiel du ratio SF-1/DAX-1 dans le control de la stéroïdogenèse par l'ACTH.

Notre équipe a identifié un nouveau gène cible de DAX-1, *akr1b7*. DAX-1 est capable de réprimer l'activité du promoteur *akr1b7* stimulé par SF-1 et lorsque les sites de liaison de SF-1 sont mutés dans le promoteur *akr1b7*, DAX-1 perd cette capacité de répression. Ces données indiquent qu'entre les deux modes de répression décrits pour DAX-1 (voir § I.D.3.b de la Bibliographie), liaison à des structures en épingle à cheveux de l'ADN ou interaction avec SF-1, c'est ce dernier mode d'action qui serait mis en jeu pour la répression du promoteur *akr1b7*. De plus, comme pour le promoteur du gène *CYP17* humain (Hanley *et al.*, 2001), la mutation d'un seul des sites de liaison importants pour la trans-activation par SF-1, suffit à abolir la répression par DAX-1 du promoteur *akr1b7*. Ces observations suggèrent que l'interaction entre SF-1 et DAX-1 est labile et qu'elle est stabilisée par l'augmentation du nombre de site possible pour cette interaction. Elles illustrent aussi la nécessité de la

modulation du ratio entre les deux partenaires (SF-1 et DAX-1) que nous avons mis en évidence pour activer ou réprimer les gènes cibles. En effet, l'ACTH influence *in vitro*, dans les cellules ATC1, et *in vivo*, chez la souris, l'accumulation des facteurs SF-1 et DAX-1. Les quantités d'ARNm et de protéine SF-1 sont augmentées en réponse à l'ACTH alors que pour DAX-1 la situation est inversée. Les modifications du ratio SF-1/DAX-1 en réponse à l'ACTH sont corrélées aux modifications d'accumulations des ARNm des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse.

Comme nous l'avons vu dans l'article 1, il semble que l'augmentation des ARNm *sf-1* soit due à une action directe de l'ACTH sur la transcription de son gène alors que les mécanismes conduisant à la repression de *dax-1* ne sont pas très clairs. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction ne nous a pas permit d'élucider le mécanisme conduisant à cette diminution des concentrations des ARNm *dax-1* en réponse à l'ACTH. S'il est clair que la répression de *dax-1* nécessite la synthèse d'une protéine labile, nous n'avons pu exclure un rôle de cette protéine au niveau de la transcription même du gène *dax-1* ou au niveau de la stabilité de son ARNm. En transfection transitoire, les 2,5kb des séquences régulatrices du gène *dax-1* ne conférent pas une inhibition transcriptionnelle en réponse à l'ACTH favorissant alors l'hypothèse d'un phénomène post-transcriptionnel comme la déstabilisation des ARNm *dax-1*. A l'inverse, il est possible que les séquences *cis* permettant la répression transcriptionnelle de *dax-1* ne se trouvent pas dans les 2,5kb séquences flanquantes que nous avons utilisé. Des expériences de run-on permettraient d'exclure ou non un rôle de l'ACTH sur la transcription de *dax-1* et seraient un préalable indispensable à la poursuite de recherches visant à élucider le mécanisme de cette régulation.

Rôle de la PRL sur la stéroïdogenèse cortico-surrénalienne.

Des travaux réalisés au laboratoire, *in vivo* chez la souris et *in vitro* dans les cellules ATC1, ont permis de montrer que la PRL exerçait un contrôle transcriptionnel sur les gènes impliqués dans la stéroïdogenèse. L'étude des voies de signalisation empruntées par la PRL mais aussi par l'ACTH dans les cellules ATC1 ont permis de montrer que ces deux hormones mobilisaient chacune JAK2 (Janus Kinase 2) et la PKA (Chambon C., rapport de Master II). La protéine JAK2 étant le médiateur majoritaire de la signalisation PRL (Bole-Feysot *et al.*, 1998).

Des expériences de transfections transitoires (promoteurs de *akr1b7* et de *star*) et des dosages de la corticostérone produite dans les milieux de culture des cellules ATC1 en réponse à l'ACTH ou à la PRL et en présence ou non d'inhibiteur spécifique de la PKA (H89)

ou de JAK2 (AG490), ont établi que la PKA est impliquée dans la signalisation de la PRL et, réciproquement, que JAK2 est mobilisé en réponse à l'ACTH. Les mécanismes exacts de cette connexion entre les deux voies de signalisation restent à définir. Il est clair que la PRL joue un rôle sur le contrôle de la fonction cortico-surrénalienne et les séquences *cis* régulatrices impliquées dans le contrôle de la transcription des gènes cibles de la stéroïdogenèse semblent être les mêmes que pour l'ACTH/AMPc. En effet, les transfections dans les cellules ATC1 démontrent qu'un élément de réponse à l'ACTH/AMPc du gène *akr1b7* (SFRE -503, (Val *et al.*, 2004) article en annexe) ou qu'un élément de réponse à la PRL (site STAT5, (Goffin *et al.*, 1996)) multimérisés devant un promoteur minimal (Tk) confèrent indifféremment une sensibilité aux deux hormones. De plus, dans ces expériences, comme précédemment, les inhibiteurs spécifiques de la PKA ou de JAK2 sont capables de s'opposer indifféremment aux effets des deux hormones sur les deux éléments de réponses (Chambon C., rapport de Master II). Il est donc vraisemblable qu'une combinaison commune de facteurs *trans* soit capable d'intégrer les signalisations initiées par l'ACTH et la PRL.

Ces données sont parfaitement en accord avec la mise en évidence de gènes cibles communs entre ACTH et PRL et le parallélisme saisissant entre leurs cinétiques de réponse (article 2, Figures complémentaires). L'ensemble de ces résultats révélé par l'utilisation de la lignée cellulaire ATC1 souligne à quel point la compréhension des mécanismes d'action de l'ACTH ne doit pas se limiter à une vision monolithique de type ACTH/AMPc/PKA. Les lignées ATC nous fournissent l'opportunité de réviser certains mécanismes du contrôle transcriptionnel des gènes où trop souvent (nous compris) l'égalité a été faite entre réponse à l'AMPc et réponse à l'ACTH. A ce propos, les causes génétiques de la déficience familiale en glucocorticoide (FGD) sont une bonne illustration de l'étendue des connaissances qu'il reste à défricher pour comprendre les mécanismes d'action de l'ACTH. En effet, parmi les patients seulement 25% présentent des mutations du récepteur à l'ACTH (MC2R), 20% présentent des mutations d'une protéine nouvellement caractérisée, MRAP (MC2R Accessory Protein), associée à MC2R et impliquée dans son adressage à la membrane (Metherell *et al.*, 2005; Metherell *et al.*, 2004) et par conséquent au moins la moitié des cas de FGD résultent de mutations dans d'autres gènes (Clark *et al.*, 2005). L'identification des mécanismes expliquant la connexion des signalisations PKA et JAK2 dans les cellules cortico-surrénaliennes pourrait être une porte conduisant à la découverte de tels gènes.

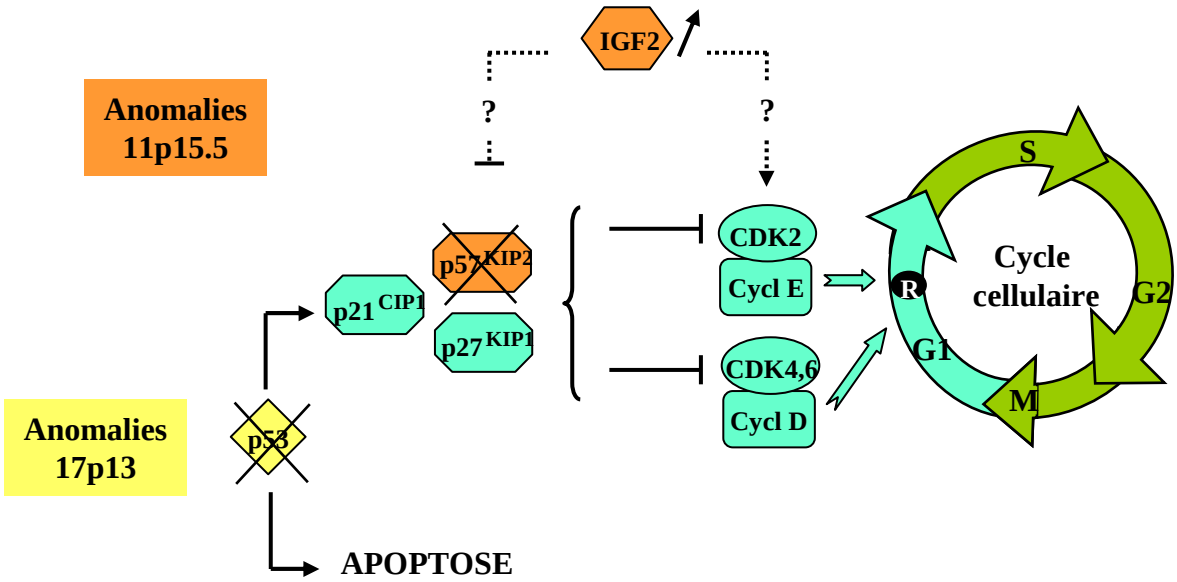


Figure II-1: **Hypothèse de travail. Intervention des anomalies en 11p15.5 et 17p13 dans le dérèglement de la transition G1/S du cycle cellulaire conduisant à la transformation maligne de la cortico-surrénale.** CDK=cyclin dependent kinase; CDKI=CDK inhibitor protein (famille CIP/KIP: $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$, $p57^{KIP2}$). R=point de restriction. La sur-expression d'IGF2 pourrait stimuler l'activité des complexes cycline/CDK de phase G1 de deux manières non exclusives: par une répression de l'expression de $p57^{KIP2}$ et/ou par une stimulation de l'expression de CDK2, 4 et de la cycline E. A l'inverse, la possibilité d'un effet de l'inactivation de $p57^{KIP2}$ sur l'expression d'IGF2 reste ouverte puisque l'ordre d'intervention des anomalies affectant IGF2 et $p57^{KIP2}$ dans le déclenchement tumoral n'a pas été définitivement établi.

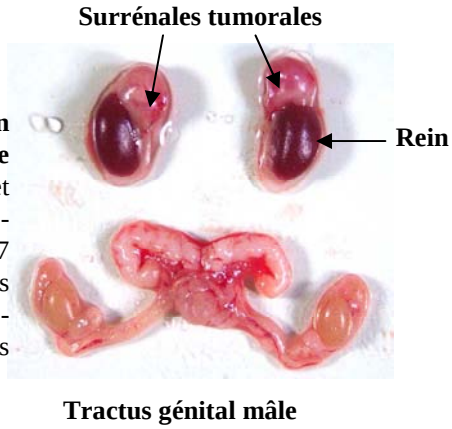


Figure II-2: **Oncogenèse ciblée dans le cortex surrénalien utilisant le promoteur -510/+41 du gène *akr1b7* et l 'oncogène antigène T du virus SV-40 (Sahut-Barnola et al, 2000).** L 'effet du transgène sur le déclenchement de tumeurs des cortico-surrénales est illustré ci-contre (fondateur F0-7 sacrifié à l 'âge de 7 mois). La pénétrance du phénotype tumoral est de 100% chez les souris mâles et 90% chez les femelles, les tumeurs cortico-surrénaliennes sont déjà très développées avant l 'âge de 4 mois (Sahut-Barnola et al, 2000).

DEUXIEME PARTIE

Projet IGF2, p57^{KIP2} et cortico-surrénalomes.

I. Introduction

Les cortico-surrénalomes (ACC) sont des tumeurs d'un très mauvais pronostic car à peine 20% des patients diagnostiqués survivent au-delà de 5 ans (Luton *et al.*, 1990). En s'appuyant sur l'analyse génétique d'un syndrome de prédisposition familiale (syndrome de Beckwith-Wiedelann) et sur de nombreux cas de cortico-surrénalomes sporadiques, il a été établi que la sur-expression d'IGF2 et la perte de l'inhibiteur de cycle cellulaire p57^{KIP2}, dont les gènes sont localisés en 11p15.5, sont presque invariablement associées au phénotype malin (Bourcigaux *et al.*, 2000; Gicquel *et al.*, 1997b). Leurs rôles avérés dans la prolifération cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire en font les meilleurs candidats pour exercer respectivement, des fonctions proto-oncogénique et suppresseur de tumeurs dans la surrénale (Figure II-1). Cependant, aucun rôle causal de ces gènes dans l'initiation du phénomène tumoral n'a été démontré. L'objectif de ce travail était de tester le pouvoir oncogénique de ces dysfonctionnements de deux manières :

- Créer des modèles animaux permettant d'évaluer *in vivo,* dans la surrénale, les capacités proto-oncogénique d'IGF2 et suppresseur de tumeurs de p57^{KIP2}.
- Explorer, en parallèle, les effets de ces anomalies d'expression *ex vivo* dans la lignée cellulaire cortico-surrénalienne ATC1.

Pour sur-exprimer IGF2 et effondrer l'expression de p57^{KIP2} dans la cortico-surrénale, notre choix s'est porté sur les régions régulatrices – 4400/+55 pb du gène humain *CYP11A1* et –510/+41 pb du gène murin *akr1b7*. Ces séquences permettent de cibler par trangenèse l'expression d'un gène d'intérêt, respectivement, dans l'ensemble du cortex surrénalien (Hu *et al.*, 1999) et dans la zone fasciculée (Martinez *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2003; Sahut-Barnola *et al.*, 2000). De plus, les travaux d'oncogenèse ciblée publiés par Mellon et al (Mellon *et al.*, 1994) et par notre équipe (Sahut-Barnola *et al.*, 2000) ont montré que ces deux séquences dirigeant l'expression de l'antigène grand T du virus SV40 (AgT), sont efficaces pour provoquer une transformation tumorale du cortex surrénalien (Figure II-2). Et enfin, ces régions promotrices présentent l'avantage d'être actives à des stades différents du

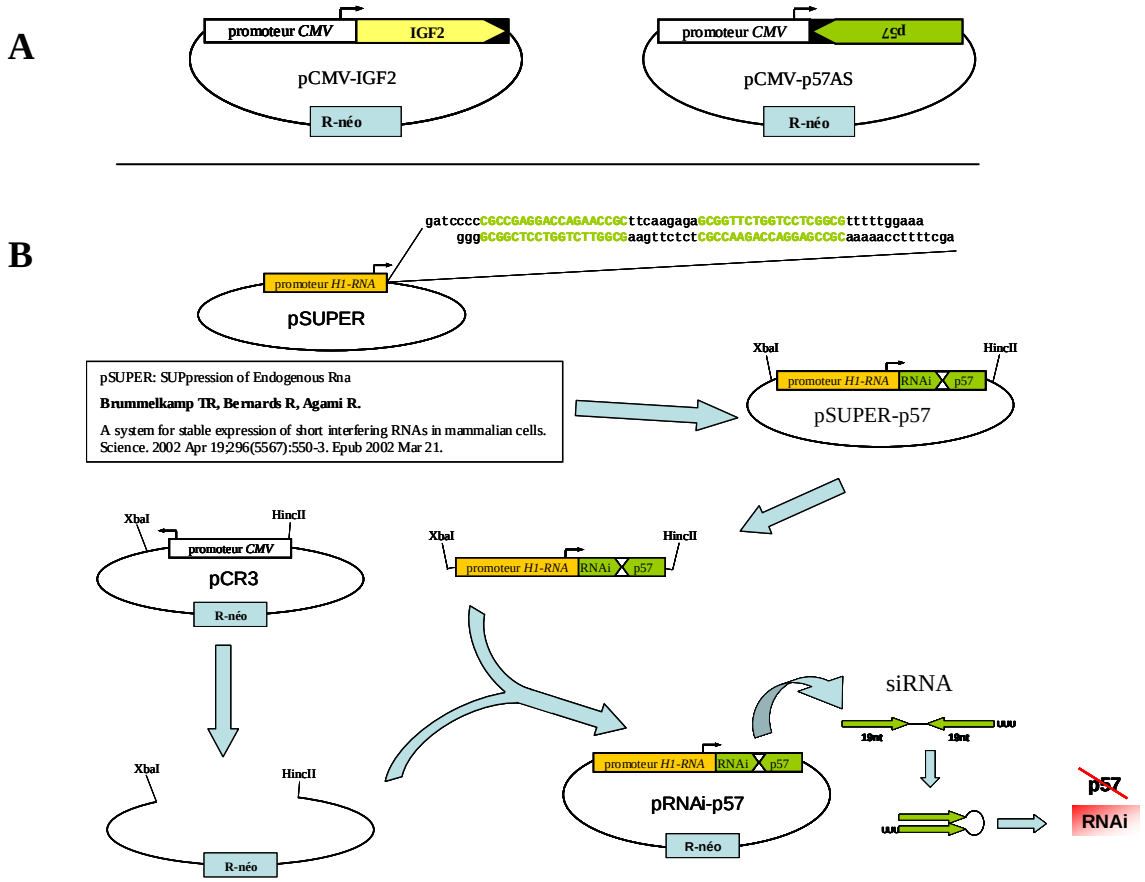


Figure II-3: **Construction des vecteurs d'expression stable destinés à sur-exprimer IGF2 et inhiber p57^{kip2} endogène dans les cellules ATC.**

A: Les ADNc murins IGF2 et p57^{KIP2} ont été insérés dans le vecteur pCR3 (Invitrogen) en aval du promoteur CMV (Cytomégalovirus), respectivement en orientation sens (pCMV-IGF2) et antisens (pCMV-p57AS).

B: Pour déclencher l'interférence de l'ARNm p57^{KIP2}, une séquence palindromique de 19 nucléotides complémentaire de la région 265/283 de l'ARNm P57^{KIP2,} a été insérée dans le plasmide pSUPER (pSUPER-p57) selon les recommandations de Brummelkamp et *al*., 2002. Puis, le promoteur CMV du vecteur pCR3 a été remplacé par les séquences du promoteur *H1-RNA* et la séquence palindromique (vecteur pRNAi-p57). L'initiation de la transcription à partir du promoteur polIII (H1-RNA) devrait conduire à l'expression stable (R-néo) d'un ARN double brin (short interfering RNA) capable de cibler la dégradation de l'ARNm pK7^{kip2} dans les cellules ATC.

développement embryonnaire de la surrénale, dès E11,5 pour *CYP11A1* et dès E13,5 pour *akr1b7*. Ceci nous permet de cibler une capacité oncogénique dans des cellules plus ou moins engagées dans la différenciation cortico-surrénalienne.

Afin de tester *ex vivo* l'effet de la sur-expression d'IGF2 et de l'inactivation de $p57^{KIP2}$ sur l'acquisition de caractères tumoraux des cellules du cortex surrénalien, il est impératif de disposer d'une lignée cellulaire ayant conservée le maximum de caractères différenciés. Les cellules ATC1 représentent à ce jour la lignée cellulaire ayant conservée le plus grand nombre de caractères différenciés de cellules cortico-surrénaliennes (Première Partie, Arcicle 1). Bien qu'elles soient dérivées d'une tumeur, ces cellules n'expriment pas IGF2 et ont un niveau d'expression de $p57^{KIP2}$ identique à une surrénale intacte, suggérant la nature bénigne de la tumeur d'origine. Leur état de différenciation et l'absence de marqueurs de malignité font de ces cellules un modèle de choix pour évaluer les effets de la sur-expression d'IGF2 et de l'inactivation de $p57^{KIP2}$ dans des cellules cortico-surrénaliennes.

II. Résultats

II.A. Exploration fonctionnelle dans la lignée cellulaire cortico-surrénalienne ATC1.

Pour essayer de comprendre *ex vivo* comment les variations d'expressions d'IGF2 et/ou de $p57^{KIP2}$ peuvent perturber le cycle cellulaire des cellules cortico-surrénaliennes, nous avons choisi de créer des clones cellulaires stables sur-exprimant IGF2 ou ayant perdu tout ou une partie de l'expression de $p57^{KIP2}$. Dans ce but, nous avons construit un vecteur d'expression portant une résistance néomycine (pCR3, Invitrogen) dirigeant l'expression d'*igf2* murin sous contrôle du promoteur CMV (cytomégalovirus) (Figure II-3-A). L'inactivation de $p57^{KIP2}$ a été entreprise de deux manières (Figure II-3), par l'introduction dans le plasmide pCR3 d'un ADNc complet de $p57^{kip2}$ en orientation inverse (approche antisens) ou par l'introduction d'une séquence palindromique complémentaire de la région 265/283 de cet ADNc sous contrôle du promoteur *H1-RNA* (pol III) générant un petit ARN double brin ou siRNA (interférence ARN ou RNAi) (Brummelkamp *et al.*, 2002).

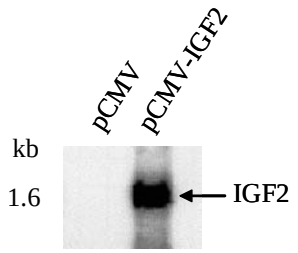


Figure II-4 : Validation de la construction 'pCMV-IGF2'
Analyse par northern-blot des transcrits IGF2 sur 10µg d'ARN totaux des cellules ATC après transfection transitoire des vecteurs pCMV ou pCMV-IGF2.

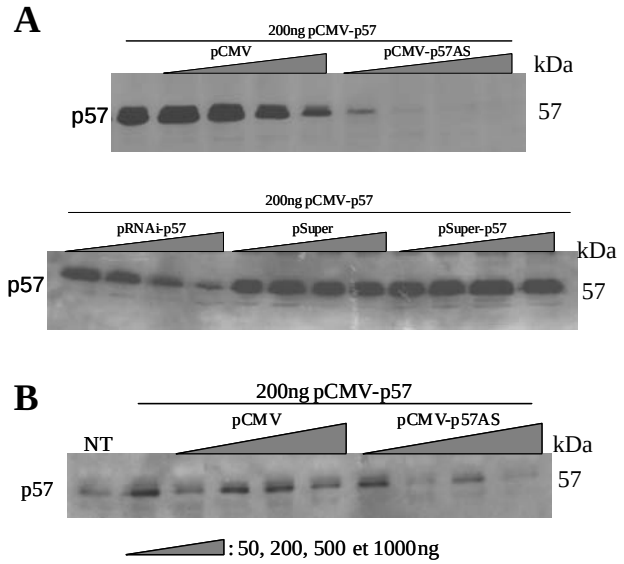


Figure II-5: **Validation des constructions 'p57'**
L'accumulation de la protéine $p57^{KIP2}$ a été analysée par western-blot sur 30µg d'extraits protéiques totaux de cellules HeLa (A) et ATC (B) après tranfection transitoire de 200ng d'un plasmide exprimant $p57^{KIP2}$ (pCMV-p57) et de doses croissantes des différents plasmides. NT: cellules non transfectées.

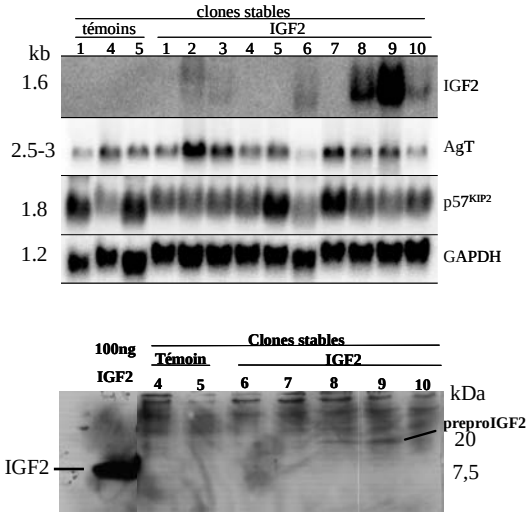


Figure II-6: Sélection des clones stables IGF2
A: Analyse par northern-blot de l'accumulation des transcrits IGF2, AgT et $p57^{KIP2}$ sur 15 µg d'ARN totaux des clones cellulaires IGF2 et témoins (transfectés avec le vecteur vide).
B: L'accumulation de la protéine preproIGF2 à été analysée par western-blot en condition non réductrice sur 100µg d'extraits protéiques totaux. Cent nanogrammes d'IGF2 recombinant ont été utilisés comme témoin.

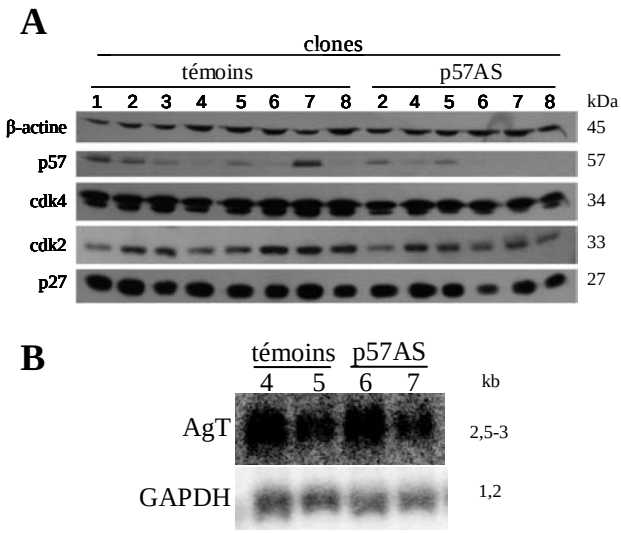


Figure II-7: Sélection des clones stables p57AS
A: Trente µg d'extraits protéiques totaux des clones cellulaires p57AS et témoins ont été utilisés pour évaluer par western-blot les niveau d'accumultation des protéines $p57^{KIP2}$, cdk2, cdk4 et $p27^{KIP1}$.
B: Comparaison par northern-blot de l'accumulation des transcrits AgT sur 15 µg d'ARN totaux entre les clones témoins et les clones p57AS.

II.A.1. Validation des constructions en transfection transitoire.

L'analyse par northern blot après transfection transitoire dans les cellules ATC1 montre que la construction destinée à sur-exprimer IGF2 (pCMV-IGF2) est bien capable de conduire à une accumulation des transcrits *igf2* (Figure II-4).

L'efficacité des constructions antisens (pCMV-p57AS) et RNAi (pRNAi-p57) destinées à bloquer l'expression de $p57^{KIP2}$ a été testée dans les cellules HeLa. Après co-transfection de ces constructions avec un plasmide sur-exprimant $p57^{KIP2}$, l'analyse en western-blot nous montre que l'approche antisens est beaucoup plus efficace que celle de l'interférence ARN (Figure II-5-A). Cette capacité de l'antisens à diminuer l'accumulation de la protéine $p57^{KIP2}$ a été confirmée de la même manière dans les cellules ATC1 (Figure II-5-B). Nous n'avons aucune explication de l'inefficacité de notre approche RNAi qui par ailleurs avait déjà donné satisfaction (Brummelkamp *et al.*, 2002). Cependant il est possible d'évoquer un mauvais choix de la séquence ciblée ou une présence trop transitoire des siRNA.

II.A.2. Sélection des clones stables

Après transfection, les cellules ATC1 ont été cultivées pendant plusieurs semaines en présence de néomycine afin de sélectionner celles ayant intégré de façon stable les vecteurs d'expression dans leur génome. Afin de ne retenir que les clones cellulaires exprimant IGF2 et présentant une diminution significative de $p57^{KIP2}$, 10 clones cellulaires pour chaque construction, obtenus par dilution limite, ont été analysés selon les cas par northern-blot (clones IGF2) ou western-blot (clones p57AS et IGF2).

Seuls les clones 8 et 9 présentent une forte accumulation de transcrits *igf2* (Figure II-6-A) et une quantité de prépro-IGF2 intra-cellulaire détectable (Figure II-6-B). Ces deux clones IGF2 montrent une expression de l'AgT sensiblement identique et comparable aux clones témoins 4 et 5. Les effets de la sur-expression d'IGF2 pourront donc être comparés chez ces différents clones. La protéine $p57^{KIP2}$ est indétectable dans les clones p57AS 6, 7 et 8 (Figure II-7-A). Cependant, elle présente aussi des variations d'accumulation dans les différents clones témoins. Les niveaux d'expression de l'AgT des clones 6 et 8 sont comparables aux clones vides 4 et 5 (Figure II-7-B).

Dans tous les cas l'intégrité et l'intégration des constructions dans le génome des cellules ont été vérifiées par Southern-blot (non montré) ce qui nous a conduit à exclure le clone p57AS 7.

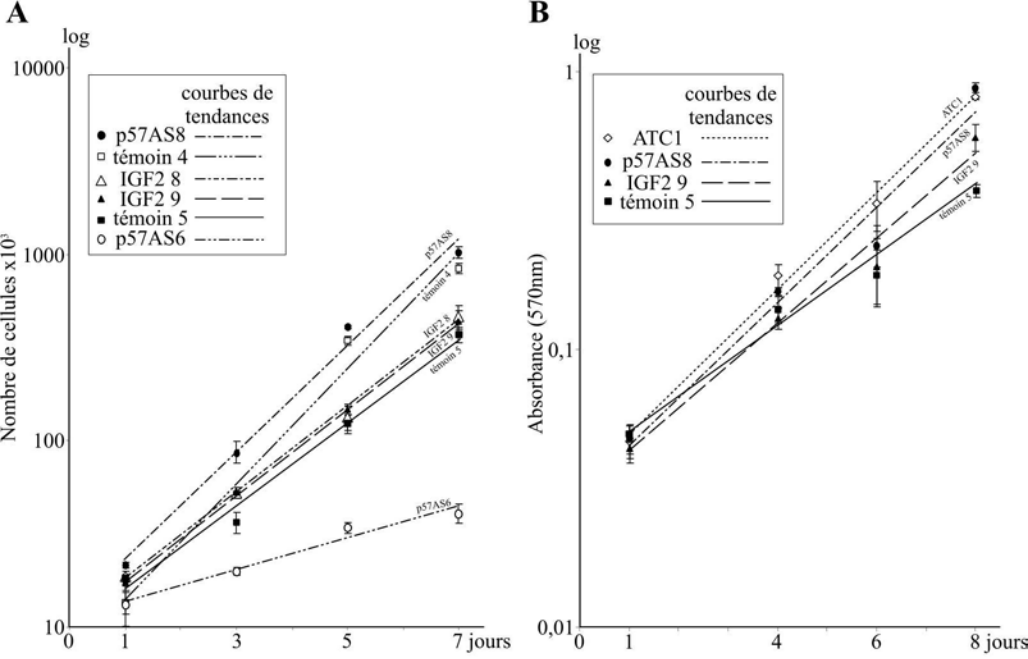


Figure II-8: Croissance cellulaire.
A: Vingt mille cellules ont été ensemencées dans des boîtes de 35mm de diamètre puis privées de sérum le lendemain. Le comptage des cellules tous les 2 jours sur une cellule de Malassez a été réalisé lors de trois expériences indépendantes.
B: Deux mille cellules par puits ont été ensemencées dans des plaques 96 puits. La croissance cellulaire a été évaluée par dosage colorimétrique au MTT (Colorimetric MTT assay, Chemicon).

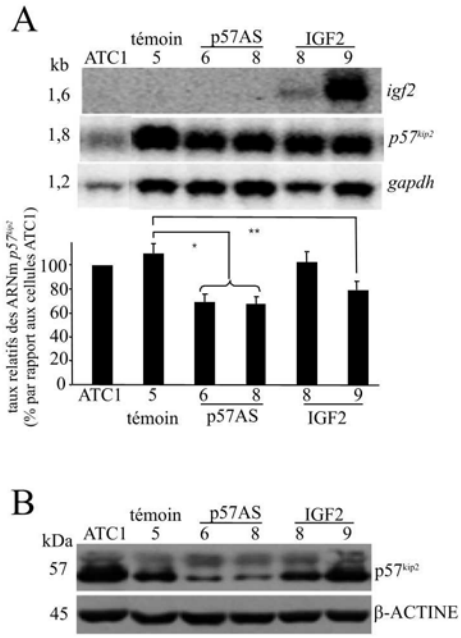


Figure II-9: Interaction IGF2/p57^{KIP2}
A: Analyse par northern-blot de l'accumulation des transcrits *igf2* et *p57^{kip2}* dans les différents clones. L'histogramme représente la moyenne de trois expériences indépendantes ±SD. L'analyse statistique a été effectuée par analyse de variance à un facteur suivi du test t de Fisher. Différence significative: * $p<0,01$; ** $p<0,05$.
B: L'accumulation de la protéine p57^{kip2} dans les différents clones à été analysée par western-blot.

II.A.3. Analyses.

II.A.3.a. Potentiel de prolifération des différents clones

Pour évaluer les capacités prolifératives des clones IGF2 et p57AS comparées à des clones témoins nous avons effectué un comptage des cellules au cours du temps. Les résultats sont rapportés figure II-8-A. La comparaison des courbes de croissance ne nous permet pas de conclure sur l'effet proliférratif de la sur-expression d'IGF2 ou de la perte de $p57^{KIP2}$. En effet, on trouve des clones possédant de fortes ou de plus faibles vitesses de croissance dans les clones p57AS comme dans les clones contrôles. Les clones IGF2 8 et 9 affichent quant à eux des vitesses de proliférations intermédiaires. L'étude plus précise qui a porté sur les clones témoin 5, IGF2 9 et p57AS8 ne nous a pas montré de modification du potentiel de prolifération. En effet, l'utilisation d'une méthode métabolique de mesure de la prolifération (Kit MTT) (Figure II-8-B) et l'analyse par cytométrie en flux de la proportion des cellules engagées dans les différentes phases du cycle cellulaire (non montré) n'ont pas révélé de différences significatives entre les différents clones et les cellules ATC1 d'origine.

II.A.3.b. « Interaction » IGF2/$p57^{KIP2}$ et cycle cellulaire

L'antisens p57 permet une diminution significative de l'accumulation des transcrits et de la protéine $p57^{KIP2}$ (Figure II-9-A et B) mais nous n'observons pas de ré-expression d'*igf2* dans ces clones cellulaires (remarque : l'ARNm *igf2* endogène a une taille de 4,7kb et n'est pas indiqué sur la figure II-9-A puisque aucun signal n'a été détecté). A l'inverse, bien que l'on observe une faible diminution des transcrit $p57^{kip2}$ dans le clone IGF2 9 (Figure II-9-A), cet effet n'est pas retrouvé au niveau protéique (Figure II-9-B). De plus, nous observons des variations d'accumulation des transcrits $p57^{kip2}$ dans les différents clones IGF2 et témoins, qu'il est impossible de corréler au niveau d'expression d'IGF2 (Figure II-6-A). En effet, les clones ayant les plus fortes expressions d'IGF2 (clones 8 et 9) ne sont pas ceux qui présentent les plus faibles quantités d'ARNm $p57^{kip2}$.

D'autre part, aucune variation significative des quantités de protéines cdk2, 4 et $p27^{KIP1}$ n'a été observée dans les cellules présentant une plus faible accumulation de $p57^{KIP2}$ (Figure II-7). Ce qui suggère, que la perte d'expression de $p57^{KIP2}$ n'est pas à l'origine de l'augmentation de l'accumulation des protéines cdk2 et cdk4 observée dans les cortico-surrénalomes (Bourcigaux *et al.*, 2000).

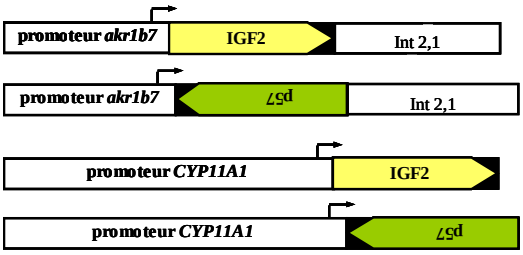


Figure II-10: **Transgènes permettant l'expression ciblée d'IGF2 et de l'antisens p57^{KIP2} dans le cortex surrénalien à partir de E11,5 (-4400/+55 *CYP11A1*) et à partir de E13,5 (-510/+41 *akr1b7*).**

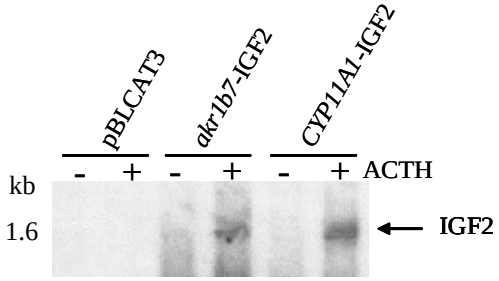


Figure II-11 : **Validation des constructions 'IGF2' destinée à la transgénèse**

Analyse par northern-blot des transcrits IGF2 sur 10µg d'ARN totaux des cellules ATC, traitées ou non pendant 8h par l'ACTH (10^{-7}M) après transfection transitoire des différents plasmides. Les constructions *akr1b7*-IGF2 et *CYP11A1*-IGF2 sont décrites sur la figure II-10. Le plasmide pBLCAT3 est utilisé comme contrôle négatif.

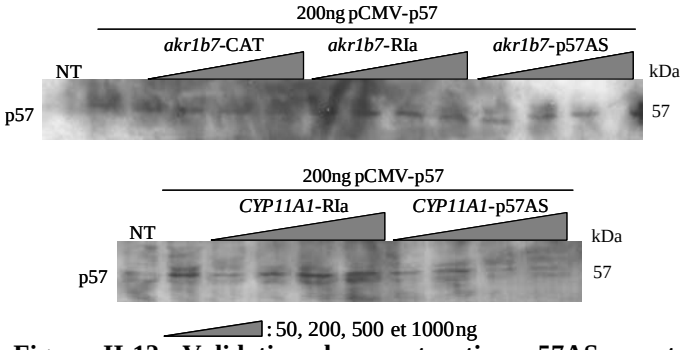


Figure II-12: Validation des construction p57AS avant la transgenèse.

L'accumulation de la protéine p57^{KIP2} a été analysée par western-blot sur 30µg d'extraits protéiques totaux de cellules ATC après co-transfection transitoire de 200ng d'un plasmide exprimant p57^{KIP2} (pCMV-p57) et de doses croissantes des différentes constructions. CAT (chloramphenicol acetyl transferase) et RIa (sous-unité régulatrice de la PKA) sous le contrôle des mêmes séquences régulatrices (*akr1b7* et *CYP11A1*) sont utilisés comme témoins. NT: cellules non transfectées.

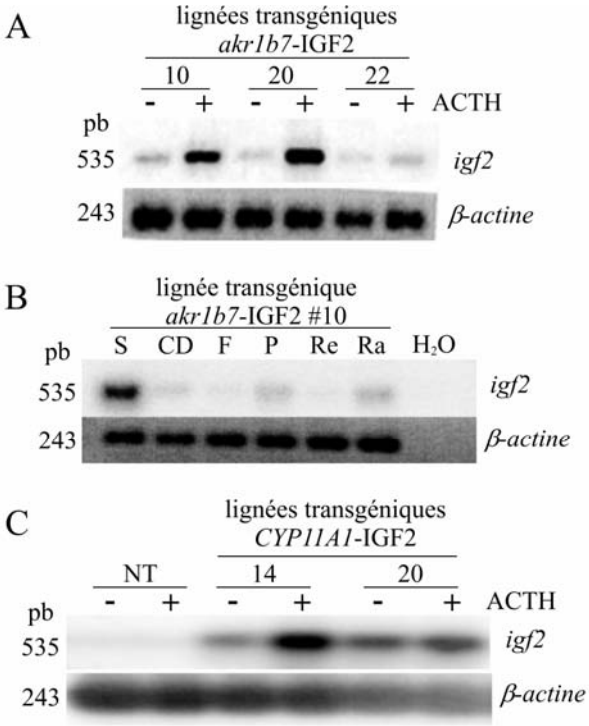


Figure II-13: Profil d'expression des transgènes *akr1b7*-IGF2 et *CYP11A1*-IGF2 L'équivalent de 200ng d'ARN de différents tissus, préalablement traités à la DNase I (Amp. Grade, Invitrogen) et rétro-transcrits en ADNc, ont servi à co-amplifier par PCR IGF2 et ß-actine. Les produits de PCR du 20ème cycle d'amplification, après transfert sur membrane de nylon, ont été hybridés avec une sonde IGF2 marquée radioactivement. La standardisation de l'amplification est faite à l'aide de la ß-actine. **A**: Comparaison des niveaux d'expressions au niveau surrénalien du transgène *akr1b7*-IGF2 entre les lignées 10, 20 et 22 chez des animaux traités ou non à l'ACTH. **B**: Profil d'expression du transgène *akr1b7*-IGF2 dans différents tissus de la lignée 10. **C**: Comparaison des niveaux d'expression surrénalienne du transgène *CYP11A1*-IGF2 entre les lignées 14 et 20 chez des animaux traités ou non à l'ACTH.
ACTH: les animaux ont reçu 2 injections de synacthene™ (1,2U) espacées de 24h et ont été sacrifiés 12h après la dernière injection.
S: Surrénale; CD: canal déférent; F: foie; Re: rein; Ra: rate, NT: animal non transgénique.

constructions	nombres de fondateurs	identifiants des fondateurs	estimation du nombre de copies du transgène	Etablissement de lignées
akr1b7 -IGF2	8	♀ F0-10	2	OUI
		♀ F0-14	4	pas de transmission du transgène en F1
		♀ F0-16	4	transgène remanié
		♀ F0-20	25	OUI
		♂ F0-22	4	OUI
		♀ F0-26	4	
		♀ F0-30	8	
		♀ F0-34	4	
CYP11A1 -IGF2	3	♂ F0-2	> à 30	mort à la naissance
		♀ F0-14	2	OUI
		♂ F0-20	5	OUI
akr1b7 -p57AS	4	♀ F0-4	3	OUI
		♀ F0-6	5	OUI
		♀ F0-23	8	OUI
		♀ F0-27	11	OUI
CYP11A1 -p57AS	7	♀ F0-5	3	
		♀ F0-6	3	OUI
		♀ F0-10	5	OUI
		♀ F0-12	9	OUI
		♂ F0-13	1	
		♂ F0-15	1	
		♀F0-17	4-5	OUI

Tableau II-1: Récapitulatifs des animaux transgéniques

II.B. Exploration fonctionnelle dans les souris transgéniques.

II.B.1. Validation des constructions avant la trangenèse

Les constructions destinées à sur-exprimer IGF2 (*akr1b7*-IGF2 et *CYP11A1*-IGF2, figure II-10) dans les surrénales ont été validées par transfection transitoire dans les cellules ATC1. A l'image des gènes *akr1b7* et *CYP11A1*, l'accumulation des transcrits IGF2 est stimulée par l'ACTH (Figure II-11). La capacité des constructions *akr1b7*-p57AS et *CYP11A1*-p57AS à bloquer l'expression de $p57^{KIP2}$ a été recherchée dans les cellules ATC1 après co-transfection avec un plasmide sur-exprimant $p57^{KIP2}$ et stimulation par l'ACTH (Figure II-12). Les deux constructions conduisent à une diminution de l'accumulation de la protéine $p57^{KIP2}$ alors que des constructions témoins contenant les mêmes séquences régulatrices mais dirigeant cette fois l'expression de CAT (chloramphenicol acetyl transferase) et de RIa (sous-unité régulatrice I alpha de la PKA), n'ont aucun effet sur l'accumulation de la protéine $p57^{KIP2}$.

Ces constructions (*akr1b7*-IGF2, *CYP11A1*-IGF2, *akr1b7*-p57AS et *CYP11A1*-p57AS) ayant démontré leur efficacité ont été linéarisées et débarrassées des séquences plasmidiques afin d'être micro-injectées dans des ovocytes fécondés de souris.

II.B.2. Souris transgéniques

Après analyses en Southern-blot plusieurs fondateurs (F0) on été identifiés pour chacune des constructions. Le nombre de fondateurs, l'estimation du nombre de copies intégrées des transgenèses et l'établissement en lignée sont rapportés dans le Tableau II-1.

Nous avons sélectionné différentes lignées de souris en fonction du niveau et du profil d'expression des transgènes.

Pour la construction *akr1b7*-IGF2 les lignées retenues sont la #10 et la #20. En effet, ce sont les deux lignées qui présentent la plus forte expression dans la surrénale en conditions basales et sous stimulation par l'ACTH (Figure II-13-A). Pour la lignée 10 l'expression est très majoritairement surrénalienne, avec cependant une faible expression dans le canal déférent et deux expressions ectopiques dans le poumon et la rate (Figure II-13-B). Concernant la construction *CYP11A1*-IGF2, deux lignées ont été établies (#14 et #20). Cependant des problèmes de reproduction nous ont fait perdre la lignée #14. Nous avons donc retenue la lignée #20. Bien que l'expression du transgène ne soit que faiblement stimulée par le traitement ACTH, ce dernier est toutefois bien exprimé dans cette lignée (Figure II-13 C).

Afin de sélectionner les lignées de souris transgéniques exprimant des doses d'antisens $p57^{kip2}$ capables d'affecter les concentrations de la protéine $p57^{KIP2}$, nous avons analysé par

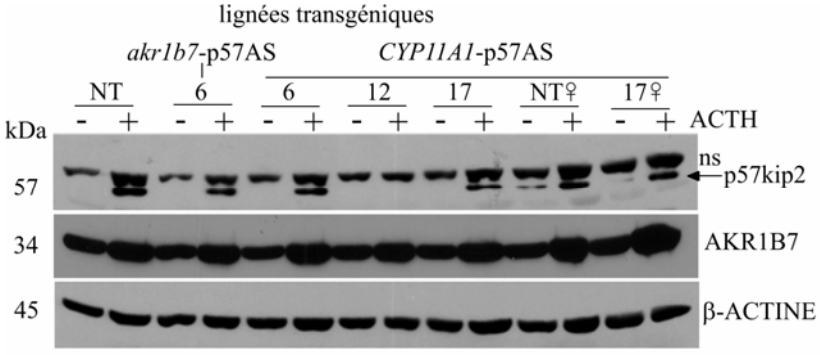


Figure II-14: Profil d'expression de p57^{kip2} dans les animaux transgénique 'p57AS'.
L'accumulation de la protéine p57^{kip2} dans les différentes lignées de souris transgéniques a été analysée par western-blot sur 20µg de d'extraits protéiques totaux de surrénales de souris mâles traitées ou non à l'ACTH. Pour la lignée *CYP11A1*-p57AS #17 des femelles ont aussi été analysées.
ACTH: les animaux ont reçu 2 injections de synacthene™ (1,2U) espacées de 24h et ont été sacrifiés 12h après la dernière injection.
ns: non spécifique, NT: non transgénique.

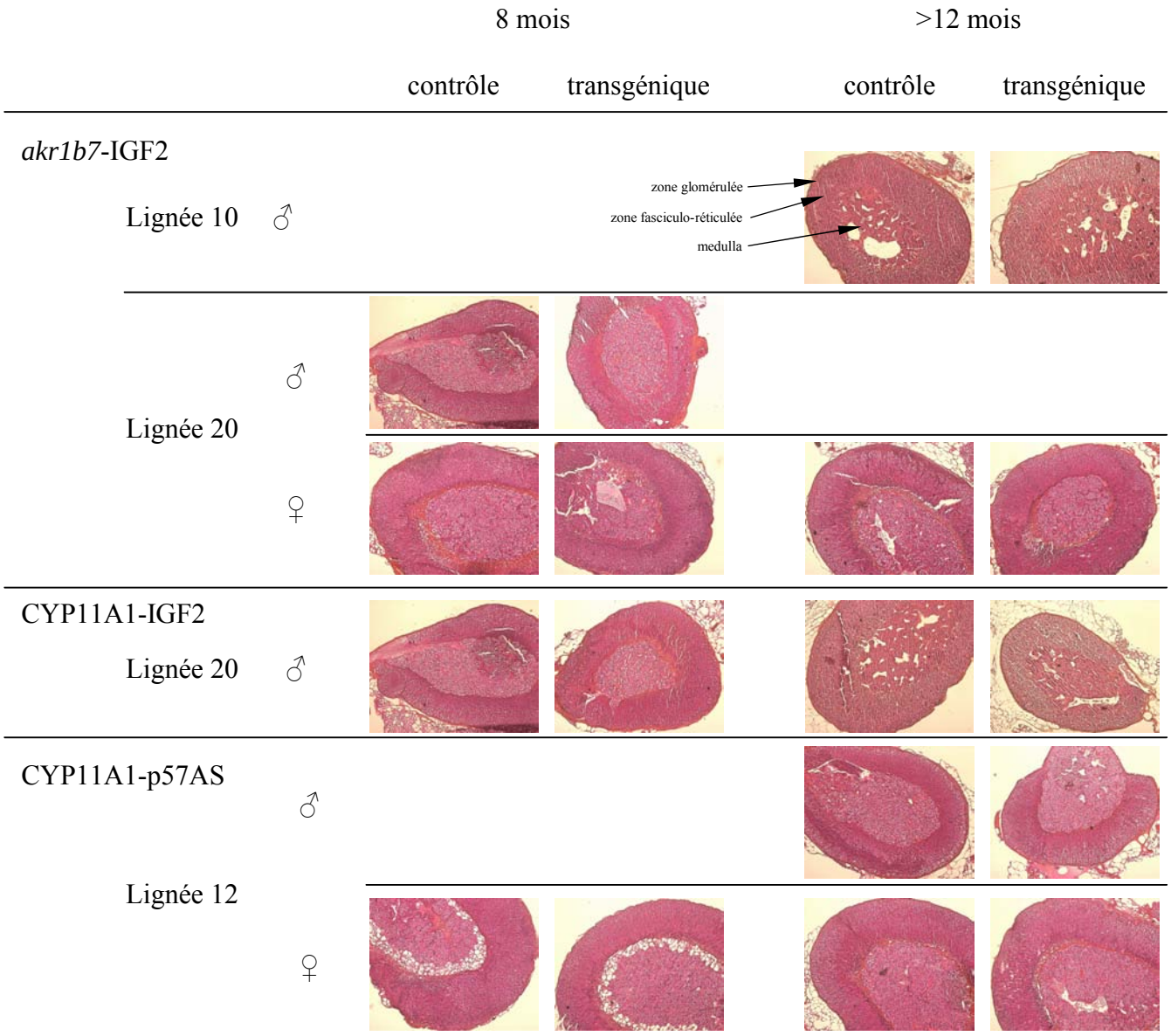


Figure II-15: Coupes histologiques de surrénales d'animaux de différentes lignées transgéniques.

western-blot l'accumulation de $p57^{KIP2}$ dans des extraits de surrénale de souris traitées ou non avec de l'ACTH (Figure II-14). L'expression de $p57^{KIP2}$ dans la surrénale est indétectable chez les mâles en conditions basales à la fois dans les animaux transgéniques et non transgéniques. En revanche, chez les femelles, $p57^{KIP2}$ semble plus fortement exprimé puisque détectable dans ces mêmes conditions. Le traitement par l'ACTH a pour conséquences d'augmenter l'accumulation de la protéine $p57^{KIP2}$ au niveau des surrénales des souris témoins (non transgéniques) et transgéniques à l'exception de la lignée *akr1b7*-p57AS #12. L'efficacité du traitement ACTH a été validée par l'augmentation de l'accumulation de la protéine AKR1B7. Au vu de ces résultats, il semble que la présence du transgène *akr1b7*-p57AS dans la lignée #12 est capable de diminuer l'expression de $p57^{KIP2}$ endogène. Cependant, des analyses complémentaires effectuées en western blot et en RT-PCR (non montrées) n'ont pas confirmé cette observation. En conclusion, aucune des lignées de souris transgéniques comportant le transgène codant l'antisens ne présentent de diminution significative de $p57^{KIP2}$. Ces mêmes transgènes étant relativement efficaces en transfection transitoire, on peut supposer qu'*in vivo* ils ne sont pas suffisamment exprimés pour avoir un quelconque effet sur l'expression endogène de $p57^{KIP2}$.

II.B.3. Analyses histologiques

Les coupes de surrénales d'animaux transgéniques de différentes lignées (*akr1b7*-IGF2 #10 et #20 ; *CYP11A1*-IGF2 #20 ; *akr1b7*-p57AS #12) ne montrent pas d'anomalies du cortex surrénalien, et ce quelque soit l'age des animaux (Figure II-15).

III. Discussion

Dans les cortico-surrénalomes, on observe très fréquemment deux types d'anomalies, la sur-expression d'IGF2 et la perte d'expression de $p57^{KIP2}$. Ces deux acteurs étant impliqués dans la prolifération et dans le contrôle du cycle cellulaire, nous voulions tester, au travers de ce projet, la possibilité qu'une seule de ces anomalies puisse être à l'origine du développement cancéreux.

Absence d'effets des anomalies d'expression d'IGF2 et de $p57^{KIP2}$ dans les cellules ATC1.

Nos résultats révèlent que les modifications d'expression d'IGF2 et de $p57^{KIP2}$ issus de transfections stables n'ont aucun effet sur l'acquisition de caractères cancéreux dans les cellules ATC1. En effet, les analyses menées sur les clones cellulaires sur-exprimant IGF2 ou présentant une perte partielle de l'expression de $p57^{KIP2}$ n'ont pas montrées d'implications de ces modifications sur l'acquisition de caractères malins comme un accroissement de la prolifération des cellules ATC1. Plusieurs explications sont envisageables pour expliquer cela :

1/ les cellules ATC1 ne possèdent pas tous les acteurs nécessaires à la production d'IGF2 mature ou le récepteur IGF1-R n'est pas présent au niveau des cellules ATC1. Pour lever ce doute, nous allons vérifier l'expression de ce récepteur par western blot sur des extraits membranaires de cellules ATC1.

2/ l'anti-sens $p57^{kip2}$ est efficace pour diminuer en transfection transitoire, mais aussi dans les clones stables, l'accumulation des ARNm $p57^{kip2}$. Cependant cette diminution n'est pas totale et peut expliquer l'absence d'effet sur la prolifération des cellules ATC1.

3/ nous pouvons aussi envisager que la double anomalie est nécessaire pour donner un avantage proliferatif aux cellules et conduire au développement tumoral. Il serait donc intéressant de co-transfecter de façon stable dans les cellules ATC1 à la fois la construction IGF2 et la construction p57AS et d'analyser les effets de leur co-existence sur la physiologie cellulaire. Il se peut aussi que les anomalies d'expression d'IGF2 et de $p57^{KIP2}$ au niveau des cortico-surrénalomes ne sont que des conséquences de la pathologie et ne participent en aucun cas à l'initiation de la tumeur.

De plus, l'hypothèse selon laquelle la modification d'expression d'un de ces deux acteurs puisse perturber celle de l'autre n'a pas été confirmée dans les cellules ATC1. Cela laisse supposer que l'association systématique de ces deux anomalies dans les cortico-surrénalomes est essentiellement due au fait que les gènes *IGF2* et $p57^{kip2}$ appartiennent au même locus sujet à d'importantes anomalies génétiques et/ou épigénétiques lors de cette pathologie ou dans le cadre du Syndrome de Beckwith-Wiedemann.

Absence d'effets des anomalies d'expression d'IGF2 et de $p57^{KIP2}$ *in vivo*.

De manière décevante, nous n'avons pas réussi à obtenir de souris transgéniques ayant perdu tout ou partie de l'expression de $p57^{KIP2}$ dans la surrénale. Bien que l'antisens p57AS ait donné satisfaction *in vitro*, il a été inefficace *in vivo* pour bloquer l'expression de $p57^{KIP2}$. Il est vraisemblable que les niveaux d'expression des transgènes ne permettent pas une

production suffisante d'antisens pour induire la destruction des ARNm *p57^{kip2}* ou perturber leur traduction.

Les animaux transgéniques sur-exprimant IGF2 dans la surrénale n'ont développé aucunes anomalies susceptibles de nous indiquer qu'IGF2 était un acteur impliquer dans l'apparition de caractères tumoraux.

Les anomalies d'expression d'IGF2 et p57^{KIP2} sont-elles des événements déclenchant le processus tumoral au sein du cortex surrénalien ?

L'ensemble des données obtenues *in vitro* et *in vivo* laisse supposer que la sur-expression d'IGF2 ou que la perte d'expression de p57^{KIP2} ne sont pas impliquées, en tout cas de façon individuelle, dans l'apparition du phénotype cancéreux des cellules cortico-surrénaliennes. En effet, nous ne pouvons pas exclure qu'il soit nécessaire d'avoir la double anomalie pour déclencher le développement tumoral.

Ce constat rejoint des résultats non publiés du groupe de JJ. Feige (INSERM EMI-105, CEA, Grenoble). La transplantation de cellules cortico-surrénaliennes bovines sur-exprimant IGF2 (transduction rétrovirale) sous la capsule rénale de souris surrénalectomisées ne conduit pas à une prolifération du néo-tissu recombinant par rapport à celui provenant de cellules contrôles, alors que les reins de ces animaux présentent de fortes anomalies de prolifération cellulaire. Ces défauts sont corrélés aux quantités importantes d'IGF2 retrouvées à ce niveau (JJ. Feige, communication personnelle). Ces observations suggèrent que la sur-expression d'IGF2 dans des cellules cortico-surrénaliennes n'est pas suffisante pour initier un développement tumoral ni même une hyperplasie dans ce tissu alors que cela conduit à d'importantes anomalies au niveau d'un tissu adjacent. Il est possible, que les cellules cortico-surrénaliennes murines et bovines soient plus « résistantes » à l'activité d'IGF2 que les cellules humaines, mais nous pouvons aussi envisager que le processus conduisant au développement tumoral au sein du cortex-surrénalien nécessite une combinaison de dérégulations : sur-expression d'IGF2, perte de p57^{KIP2}, anomalies d'autres voies de signalisation (PKA, MAPK, Wnt/ß-caténine…). Ce dernier aspect sera abordé dans la conclusion générale.

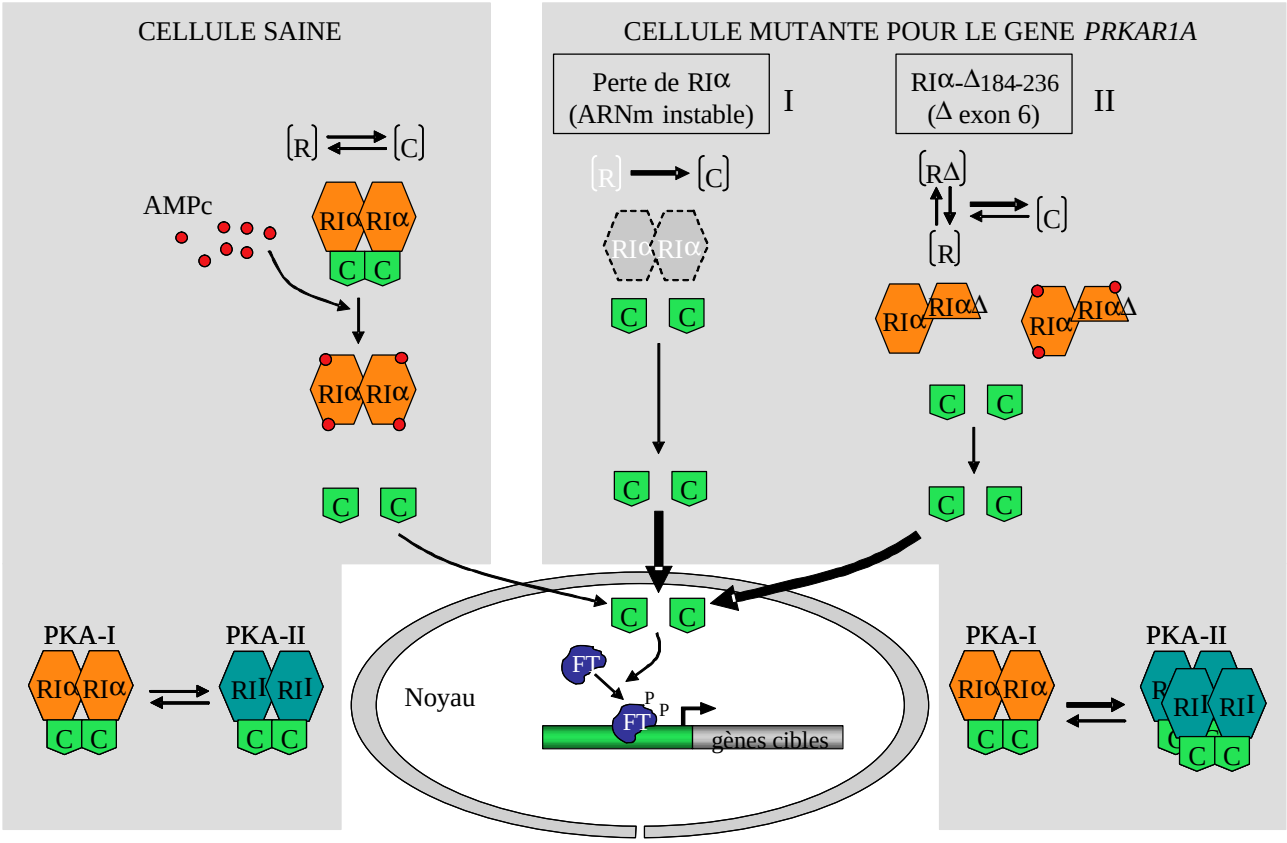


Figure III-1: **Conséquences des mutations du gène *PRKAR1A* détectées dans les PPNAD sur l'activité PKA.**
La PKA est un tétramère constitué de 2 sous-unités régulatrices (R) et de 2 sous-unités catalytiques (C). La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices libère les sous-unités catalytiques. Modèle illustrant les effets supposés des mutations observées dans le complexe de Carney: l'accroissement de l'activité PKA est figuré par la libération accrue des sous-unités catalytiques suite aux mutations inactivatrices (I) ou transdominantes (II) touchant la sous-unité régulatrice RIa ; l'absence de la sous-unité RIa (ou son incapacité à relayer les effets l'AMPc) est compensée par une sur-représentation des sous-unités RII, avec pour conséquence, le déplacement d'un certain équilibre entre les holoenzymes PKA-I et PKA-II dans la cellule saine vers une sur-représentation de l'holoenzyme PKA-II dans la cellule déficiente en RIa (respectivement en bas à gauche et à droite).

TROISIEME PARTIE

Projet RIa et PPNAD.

I. Introduction

Les hyperplasies micronodulaires pigmentées du cortex surrénalien (PPNAD) sont des tumeurs endocrines bénignes hypersécrétantes observées dans un syndrome héréditaire multinéoplasique rare, le complexe de Carney (CNC) (Voir § III.C.5.).

A ce jour, il est possible de corréler le développement des PPNAD à 2 groupes de mutations touchant le gène *PRKAR1A* (Figure III-1).

1) Le groupe le plus représenté correspond à des mutations qui affectent la stabilité de l'ARNm et aboutissent à la perte de l'expression de l'allèle muté. Dans la plupart des cas, l'allèle sauvage est éliminé par perte d'hétérozygotie et suggère fortement une activité suppresseur de tumeur de *PRKAR1A*.

2) Le second groupe de mutations, réduit à quelques cas, conduit à l'expression d'une sous-unité tronquée sans perte allélique.

Chez une mère et son fils atteints du complexe de Carney, Groussin et al (2002) ont décrit une mutation (exon 6 IVS +1G-T) à l'état hétérozygote au niveau du site donneur d'épissage de l'intron 6 du gène *PRKAR1A*. Dans ce cas, l'épissage ne peut se faire correctement qu'entre le site donneur de l'intron 5 et le site accepteur de l'intron 6. Cette mutation produit donc, un ARNm délété de l'exon 6 qui contient exactement 53 codons. Il n'y a donc pas de décalage du cadre de lecture et cet ARNm code une sous-unité tronquée RIa?184-236 (ou RIa?) détectable en western blot. Cette protéine coexiste avec la forme sauvage dans presque toutes les tumeurs détectées chez ces patients. En effet, à l'exception de la tumeur pancréatique qui n'exprime que la forme tronquée associée à une perte de l'allèle sauvage, les tumeurs ne présentent pas de perte d'hétérozygotie pour le gène *PRKAR1A*. La protéine RIa? agirait donc de manière trans-dominante. En accord avec cette hypothèse l'expression de ce mutant en transfection transitoire conduit à l'augmentation de la tanscription basale et induite par l'AMPc, d'un gène rapporteur sous le contrôle de séquence régulatrice contenant des éléments de réponse à l'AMPc (CRE), traduisant un accroissement de l'activité de la voie de la PKA (Groussin *et al.*, 2002b).

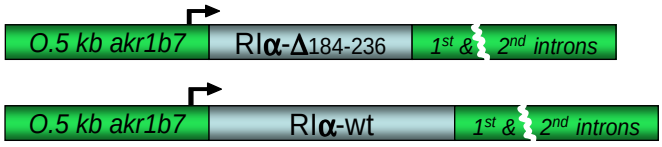


Figure III-2: **Transgènes pour l'expression ciblée de RIα-Δ184-236 et de RIα-wt dans le cortex surrénalien**

constructions	nombres de fondateurs	identifiants des fondateurs	estimation du nombre de copies du transgène	Etablissement de lignées
akr1b7-RIαΔ	11	♀ F0-5	1-2	
		♀ F0-8	1-2	
		♀ F0-12	2-3	mort
		♀ F0-13	6-7	OUI
		♀ F0-14	10-11	OUI
		♀ F0-15	3-4	
		♂ F0-24	3-4	OUI
		♂ F0-28	1-2	
		♀ F0-30	5-6	
		♂ F0-32	1-2	OUI
		♂ F0-35	7-8	OUI
akr1b7-RIαwt	9	♀ F0-2	5-5	
		♀ F0-7	2-3	
		♀ F0-8	13-14	
		♀ F0-11	4-6	OUI
		♂ F0-14	18-19	OUI
		♂ F0-17	1-2	
		♀ F0-18	3-4	OUI
		♂ F0-23	1-2	
		♂ F0-24	1-2	

Tableau III-1: Récapitulatifs des animaux transgéniques

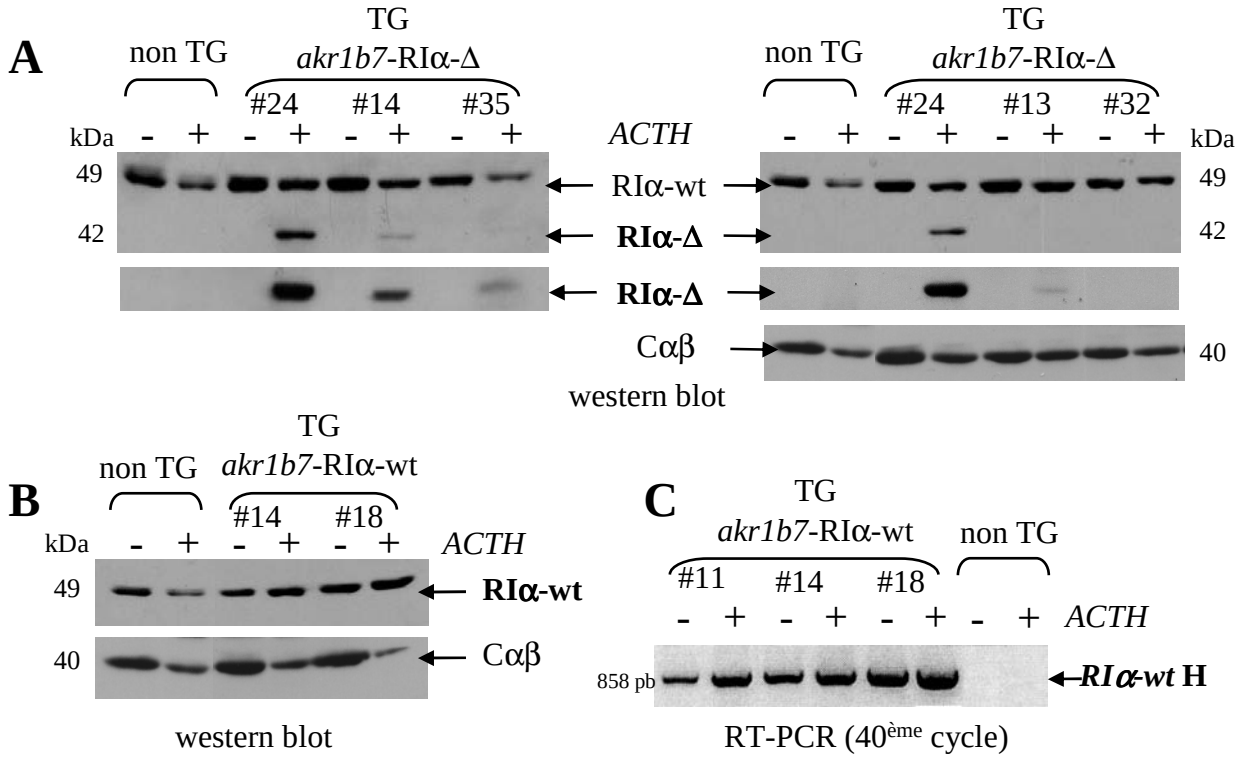


Figure III-3: Profil d'expression des transgènes *akr1b7*-RIα-Δ et *akr1b7*-RIα-wt

L'accumulation des protéines RIα et RIαΔ184-236 dans les différentes lignées de souris transgéniques a été analysée par western-blot sur 25µg d'extraits protéiques totaux de surrénales de souris mâles traitées ou non à l'ACTH. **A**, Le transgène *akr1b7*-RIα-Δ conduit à une expression ciblée et inductible par l'ACTH de RIαΔ184-236 (RIα-Δ) dans la surrénale. **B**, Le transgène *akr1b7*-RIα-wt permet une sur-expression de RIα dans les surrénales des animaux transgéniques traités par l'ACTH. **C**, Comparaison des niveaux d'expressions par RT-PCR au niveau surrénalien du transgène *akr1b7*-RIα-wt chez des animaux traités ou non à l'ACTH. L'équivalent de 200ng d'ARN de surrénales, préalablement traités à la DNase (Amp. Grade, Invitrogen) et rétro-transcrits en ADNc, ont servi à amplifier la sous-unité RIα humaine (*RIα-wt* H) codée par le transgène *akr1b7*-RIα-wt à l'aide d'oligos spécifiques. ACTH: les animaux ont reçu 2 injections de synacthene™ (1,2U) espacées de 24h et ont été sacrifiés 12h après la dernière injection.

Cette mutation s'adaptant bien à une approche de transgenèse additionnelle, nous avons choisi de cibler l'expression de ce transdominant dans le cortex surrénalien en utilisant les régions régulatrices du gène *akr1b7*. Ce modèle de souris transgénique a pour but, d'une part, de tester *in vivo* la capacité trans-dominante de ce mutant naturel de RIa, c'est-à-dire, est-il capable d'induire l'hyperactivité endocrine et/ou d'initier des tumeurs ? et d'autre part, d'obtenir un modèle physiopathologique de PPNAD.

II. Résultats

II.A. Constructions et souris transgéniques

Afin de comprendre *in vivo* comment le mutant RIa? 184-236 (RIa-?) peut induire des PPNAD et perturber l'activité endocrine des cellules cortico-surrénaliennes, nous avons inséré l'ADNc correspondant à ce mutant ou celui de la forme sauvage en aval des séquences régulatrices –510/+41 du gène *akr1b7* permettant de cibler l'expression du trangène dans le cortex surrénalien. L'utilisation du transgène codant la sous-unité sauvage présente un double intérêt : servir de contrôle à la construction mutante et tester l'hypothèse controversée selon laquelle la sur-expression de RIa pourrait avoir, dans certains cas, un effet oncogénique (Tortora and Ciardiello, 2002).

Après validation des constructions par transfection cellulaire, les 2 transgènes dirigeant soit l'expression du mutant (*akr1b7*-RIa-?) soit celle de la forme sauvage (*akr1b7*-RIa-wt) (Figure III-2) ont été micro-injectés dans des ovocytes de souris. Respectivement 11 et 9 fondateurs ont été obtenus avec chacun des transgènes (Tableau III-1).

Les analyses menées sur les lignées établies montrent que 4 lignées *akr1b7*-RIa-? présentent une expression de la protéine RIa? 184-236 induite par l'ACTH dans les extraits de surrénales (Figure III-3-A). Notons que dans ces expériences l'expression du transgène est indétectable en absence de toute stimulation hormonale.

Le transgène *akr1b7*-RIa-wt produit une protéine de même poids moléculaire que la forme endogène ce qui nous empêche de discriminer la protéine humaine (issue du transgène) de la protéine murine (endogène). Pour contourner ce problème, nous avons utilisé le fait que, d'une part, le transgène *akr1b7*-RIa-wt est sensible à l'ACTH et, d'autre part, qu'après un traitement à l'ACTH, il est systématiquement observé une diminution de l'accumulation de la sous-unité RIa sauvage endogène dans les animaux contrôles et transgéniques pour la

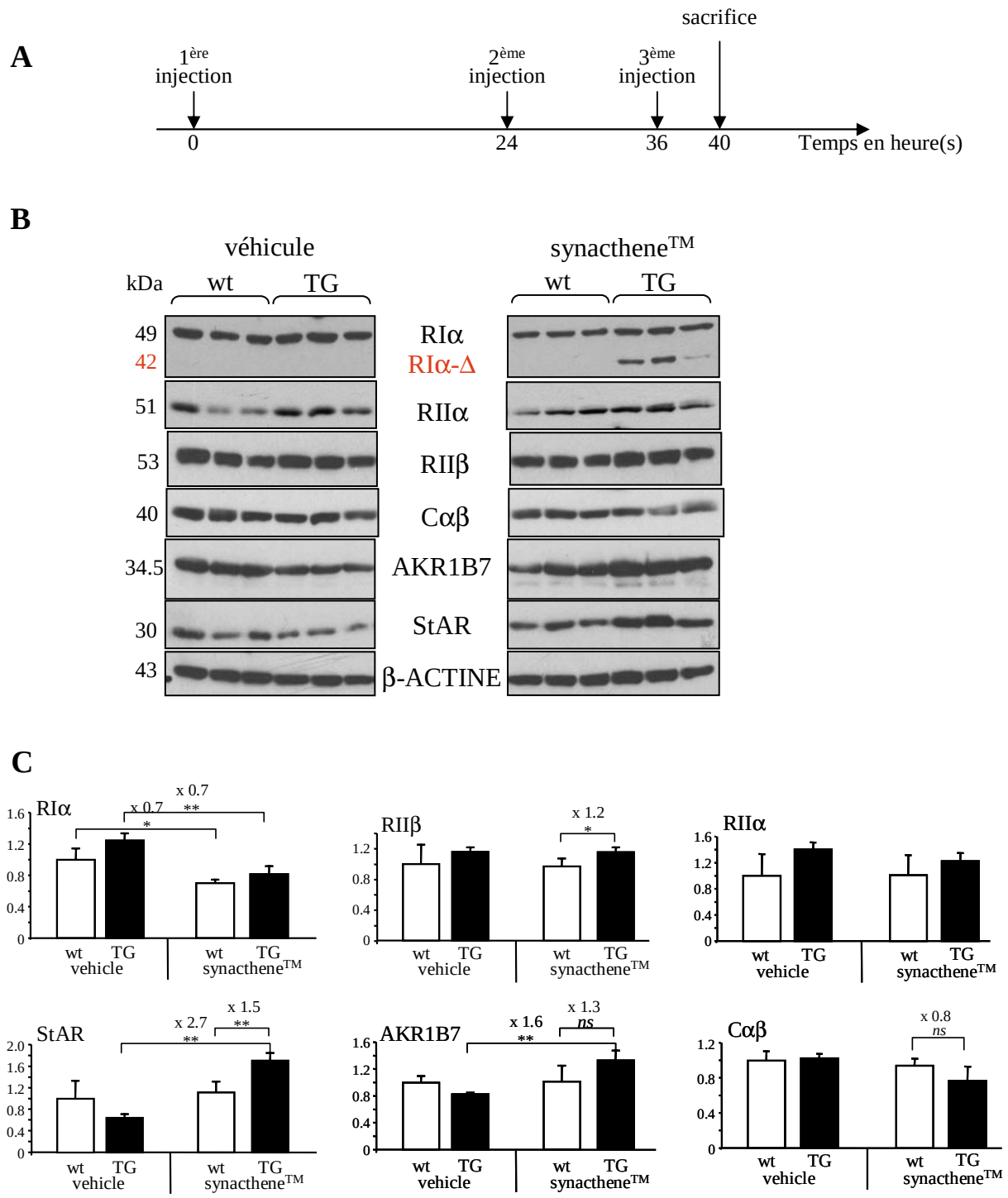


Figure III-4: Sur-expression de RIα-Δ184-236 dans la cortico-surrénale. Des souris mâles sauvages (wt) ou transgéniques (TG) pour la construction *akr1b7*- RIα-Δ184-236 (lignée #24) ont reçu des injections de sérum physiologique (véhicule) ou d'ACTH (synacthene™, 2 injection de 1,2U espacées de 24h et une 4h avant le sacrifice 40h après la 1ère injection). **A**, représentation schématique du protocole d'injection et du sacrifice. **B**, analyse par western blot des extraits protéiques de surrénale montrant l'impact du transgène sur l'expression de protéines intervenant dans la stéroïdogenèse et sur certains acteurs de la signalisation PKA. Chaque piste correspond à un animal. **C**, quantification densitométrique des signaux correspondants pondérée par la β-actine (moyenne ± SD). Le seuil de significativité a été fixé pour une valeur de $p<0.05$ (*) et $p<0.01$ (**). *ns*, non significatif.

construction *akr1b7*-RIa-? 184-236 (Figure III-3). Nous avons donc recherché, en réponse à l'ACTH, une augmentation du signal correspondant à la forme sauvage de RIa dans les souris transgéniques par rapport aux souris contrôles (non transgéniques). Les deux lignées analysées en western-blot (Figure III-3-B) présentent une faible augmentation du signal RIa traduisant ainsi une sur-expression de RIa par le transgène *akr1b7*-RIa-wt en réponse à l'ACTH. Ces résultats ont ensuite été confirmés par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de la sous-unité RIa humaine codée par le transgène (Figure III-3-C). La lignée #11, testée uniquement en RT-PCR, présente aussi une expression du transgène inductible par l'ACTH (Figure III-3-C).

II.B. Modèle de souris testant l'effet du mutant RIa? 184-236

Les études menées jusqu'à ce jour se sont portées essentiellement sur la lignée *akr1b7*-RIa-? #24 car elle présente la plus forte accumulation de la protéine RIa? 184-236 en réponse à l'ACTH (Figure III-3-A)

II.B.1. Caractérisations moléculaire et hormonale de la lignée *akr1b7*-RIa-? #24

Nous avons effectué deux types d'expériences. La première, présentée figure III-4, correspond à des animaux ayant reçu plusieurs injections d'ACTH retard sur une durée totale de 40 heures, la dernière injection ayant eu lieu 4h avant le sacrifice (Figure III-4-A), alors que pour la seconde expérience (Figure III-5), nous avons injecté une dose unique d'ACTH retard et sacrifié les animaux à différent temps (Figure III-5-A). Pour ces deux expériences, nous avons comparé les effets de l'ACTH sur les différentes sous-unités de la PKA (RIa, RIIa, RIIß, Caß) et sur des protéines impliquées dans les étapes importantes de la biosynthèse des stéroïdes, et dont l'expression est sensible à la voie de la PKA (StAR, SR-BI et AKR1B7) chez des animaux transgénique (*akr1b7*-RIa-? #24) et des animaux sauvages.

Tout d'abord, chez des animaux sauvages nous pouvons distinguer 3 groupes de protéines en se basant sur leur sensibilité hormonale :

<u>Le premier groupe</u>, correspond à des protéines dont l'accumulation est augmentée en réponse à l'ACTH. Ce sont les protéines dont les gènes sont connus pour être sensibles à la voie AMPc et impliquées dans la synthèse des stéroïdes : StAR, SR-BI et AKR1B7. La faible

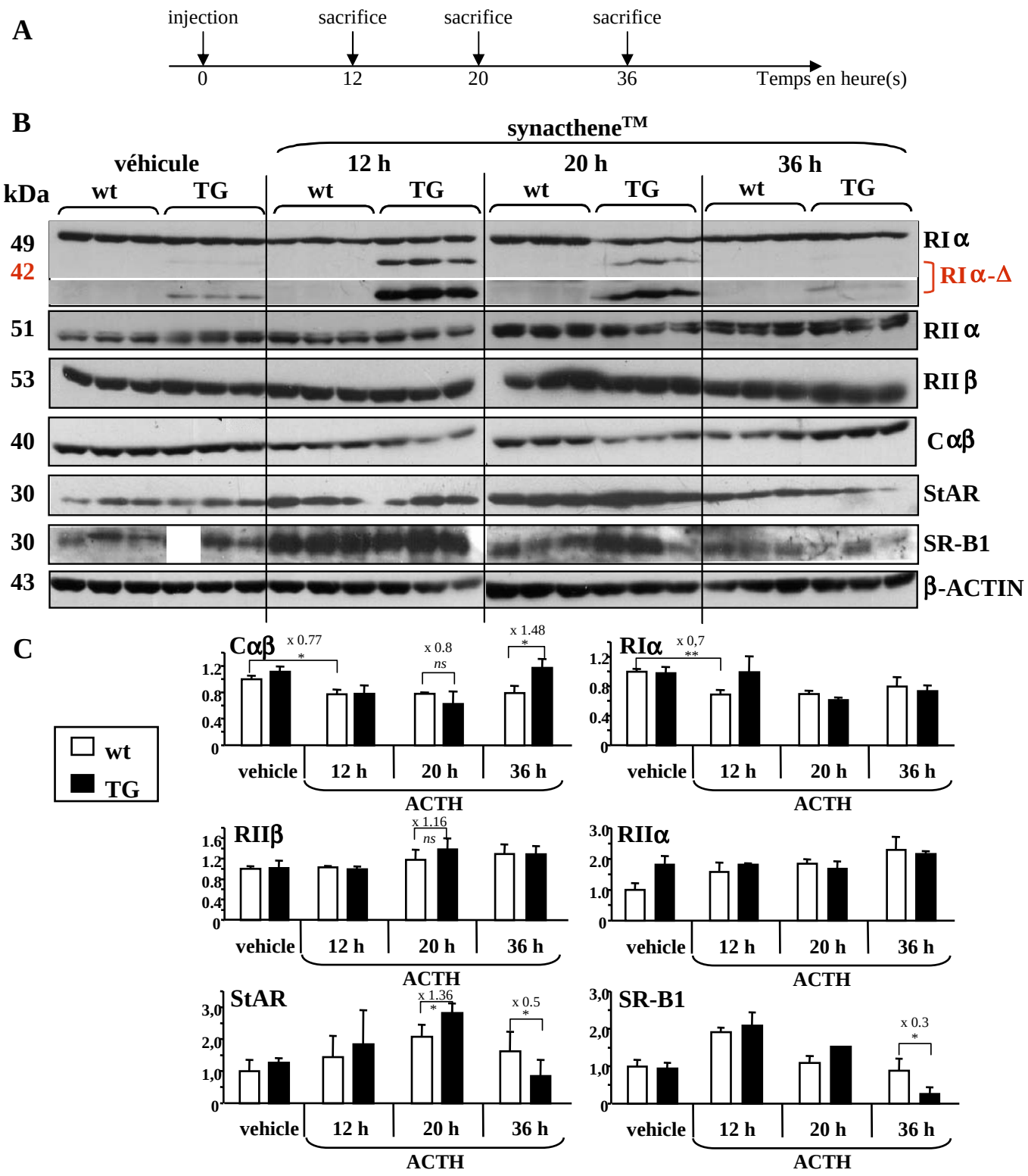


Figure III-5: **Effets au cours du temps d'une stimulation ACTH chez des animaux transgéniques exprimant la protéine RIα-Δ184-236.** Des souris mâles sauvages (wt) ou transgéniques (TG) pour la construction *akr1b7*- RIα-Δ184-236 (lignée #24) ont reçu une injection unique de sérum physiologique (véhicule) ou d'ACTH (synacthene™, 1,2U) et ont été sacrifiés 12h, 20h ou 36h après l'injection. **A**, représentation schématique du protocole d'injection et des sacrifices. **B**, analyse par western blot des extraits protéiques de surrénale montrant l'impact du transgène sur l'expression de protéines intervenant dans la stéroïdogenèse et sur certains acteurs de la signalisation PKA. Chaque piste correspond à un animal. **C**, quantification densitométrique des signaux correspondants pondérée par la β-actine (moyenne ± SD). Le seuil de significativité a été fixé pour une valeur de $p<0.05$ (*) et $p<0.01$ (**). *ns*, non significatif.

stimulation observée (Figure III-4 et III-5) est due au fait que nous n'avons pas inhibé la production d'ACTH endogène chez ces souris. Les gènes cibles sont donc déjà stimulés par l'ACTH endogène ce qui masque en partie les effets de l'injection d'ACTH retard.

Le deuxième groupe correspond à des protéines dont l'accumulation diminue en réponse à l'ACTH. En effet, comme nous l'avions déjà observé précédemment (Figure III-3), l'accumulation de RIa (Figure III-4 et 5) et de Caß (Figure III-5) diminue chez des animaux sauvages respectivement de 30 et 20% après un traitement ACTH.

Le troisième groupe, correspond aux protéines dont l'accumulation semble insensible à l'ACTH chez des animaux sauvages. C'est le cas de RIIß et de RIIa (Figure III-4).

Ensuite, nous avons analysé chez les animaux transgéniques, en réponse à une dose unique d'ACTH, le profil l'expression du transgène *akr1b7*-RIa? et, par conséquent, l'accumulation de la protéine RIa? (Figure III-5). La protéine mutante RIa? est faiblement détectable en condition basale, puis s'accumule fortement après 12h de traitement (autant de protéine RIa? que de protéine RIa endogène) et enfin, le signal décroît à 20h pour revenir au niveau basal à 36h. Dans l'expérience présentée figure III-4, la forte accumulation de la protéine RIa? après 40h de stimulation n'est pas en contradiction avec la cinétique présentée figure III-5. En effet, ce que nous observons figure III-4 correspond au cumul des effets de plusieurs injections, la dernière ayant eu lieu 4h avant le sacrifice.

Afin de tester l'hypothèse d'une implication de la protéine RIa? dans l'hyperactivité endocrine rencontrée chez les patients porteurs de cette mutation, nous avons recherché chez les animaux transgéniques si son expression pouvait perturber la voie de la PKA. Pour cela nous avons recherché d'éventuelles modifications d'expression des différentes sous-unités de la PKA (RIa, RIIa, RIIß, Caß) et des protéines sensibles à cette voie, StAR, SR-BI et AKR1B7.

Premièrement, la sensibilité de la protéine StAR à l'induction par l'ACTH et, dans une moindre mesure, celle de AKR1B7 et de SR-BI est renforcée chez les souris transgéniques (Figure III-4 et 5). En effet, il y a une plus forte accumulation de ces protéines chez les animaux transgéniques par rapport aux animaux contrôles traités à l'ACTH. Lors de la cinétique de stimulation ACTH (Figure III-5) ces effets sont les plus marqués pour StAR à 20h. De façon surprenante, après 36h, la situation est, en quelque sorte, inversée et nous observons moins de protéines StAR et SR-BI chez les animaux transgéniques que chez les contrôles.

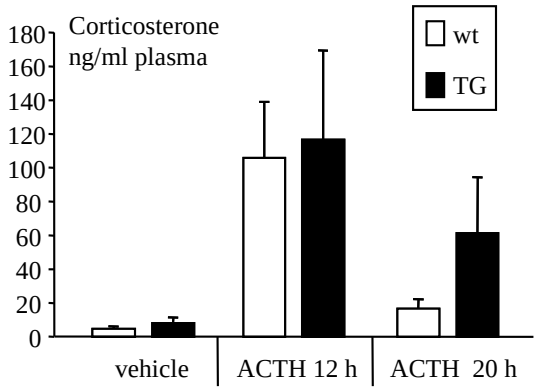


Figure III-6: **Cinétique de production de corticostérone en réponse à l'ACTH chez des animaux transgéniques (TG) sur-exprimant RIα-Δ184-236 dans la cortico-surrénale comparé à des animaux sauvages (wt).** Les concentrations de corticostérone ont été déterminées par dosage radio-immunologique sur les prélèvements de plasma des souris qui ont servi pour les analyses western blot présentées figure III-5.

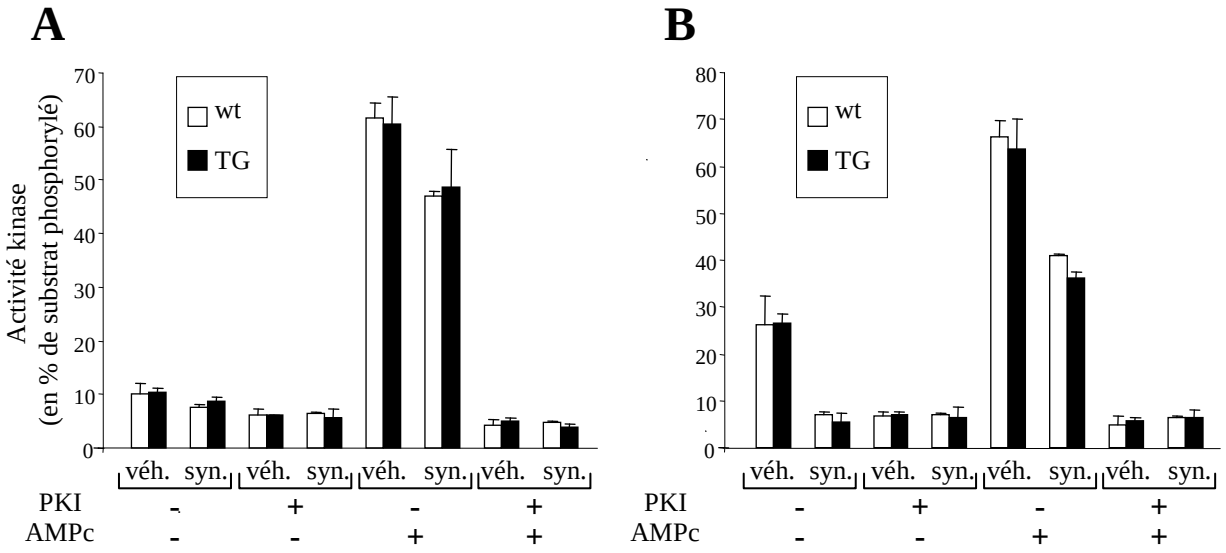


Figure III-7: Impact sur l'activité PKA de la sur-expression de RIα-Δ184-236 dans la cortico-surrénale.
L'activité PKA a été mesurée à l'aide du Kit PepTag assay (Promega). Des souris mâles sauvages (wt, □) ou transgéniques (TG, ■) pour la construction *akr1b7*- RIα-Δ184-236 (lignée #24) ont reçu des injections de sérum physiologique (véhicule) ou d'ACTH (synacthene^{TM}) soit pendant 12h (**A**) soit pendant 40h (**B**). L'activité catalytique libre présente dans les extraits protéiques de surrénales est mesurée en absence d'AMPc tandis que l'activité totale est obtenue après dissociation de l'holoenzyme en présence d'AMPc (+AMPc). L'incubation avec le peptide inhibiteur de la PKA (+PKI) permet de visualiser l'activité de phosphorylation spécifique de la sous-unité catalytique. L'activité kinase correspond à la mesure par spectrofluorimétrie de la forme phosphorylée pondérée par la quantité totale de substrat et exprimée en pourcentage. Chaque barre correspond à la moyenne des valeurs ± SD de trois animaux.
Les mêmes animaux ont servi pour les analyses western blot présentées respectivement **A**, Figure III-5 et **B**, Figure III-4.

Deuxièmement, la diminution de l'accumulation de la sous-unité catalytique (Caß) en réponse à l'ACTH semble plus importante chez les animaux transgéniques (Figure III-5). Bien que la différence de 20% par rapport à des animaux sauvages ne soit pas statistiquement significative, elle est reproductible (Figure III-4 et 5). Cette diminution à lieu 20 h après l'injection d'ACTH (Figure III-5) et, à l'image de l'observation faite pour les protéines StAR et SR-BI, la situation s'inverse à 36h, où nous retrouvons une plus grande quantité de Caß chez les animaux transgéniques.

Troisièmement, les animaux transgéniques traités avec de l'ACTH présentent une augmentation d'environ 20% de RIIß par rapport à des animaux contrôles (Figure III-4 et Figure III-5 20h).

Ces résultats suggèrent que l'expression de la protéine mutante RIa? conduit *in vivo* à des perturbations de la voie de signalisation PKA. Mais cela est-il suffisant pour entraîner une hyperactivité endocrine ?

L'injection d'ACTH conduit à une augmentation transitoire de la quantité de corticostérone produite chez des animaux sauvages et transgéniques (Figure III-6). Douze heures après l'injection d'ACTH, aucune différence n'est observée entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques alors que 20h après le traitement la quantité de corticostérone dans le plasma des animaux transgéniques est significativement plus élevée que chez les animaux contrôles.

Il est intéressant de noter que l'accumulation maximale de la protéine mutante RIa? en réponse à l'ACTH a lieu aux alentours de 12h et que les effets les plus marqués sur les gènes cibles et sur la production de corticostérone ont lieu de façon décalée dans le temps, à 20h.

II.B.2. Impact sur l'activité PKA

Chez les animaux transgéniques, la voie de la PKA est perturbée ce qui conduit à une sensibilité accrue de StAR, SR-BI et AKR1B7 à l'ACTH, associée à une plus forte production de corticostérone. Mais qu'en est il de l'activité PKA chez ces animaux transgéniques ?

L'activité PKA présente dans les extraits protéiques des surrénales d'animaux transgéniques a été comparée à celle d'animaux contrôles (Figure III-7). L'activité catalytique de la PKA libre mesurée en absence d'AMPc ou l'activité totale obtenue en présence d'AMPc est identique chez les animaux transgéniques et chez les animaux contrôles et ceci quelque soit le traitement hormonal administré pendant 12h (Figure III-7-A) ou 40h (Figure III-7-B).

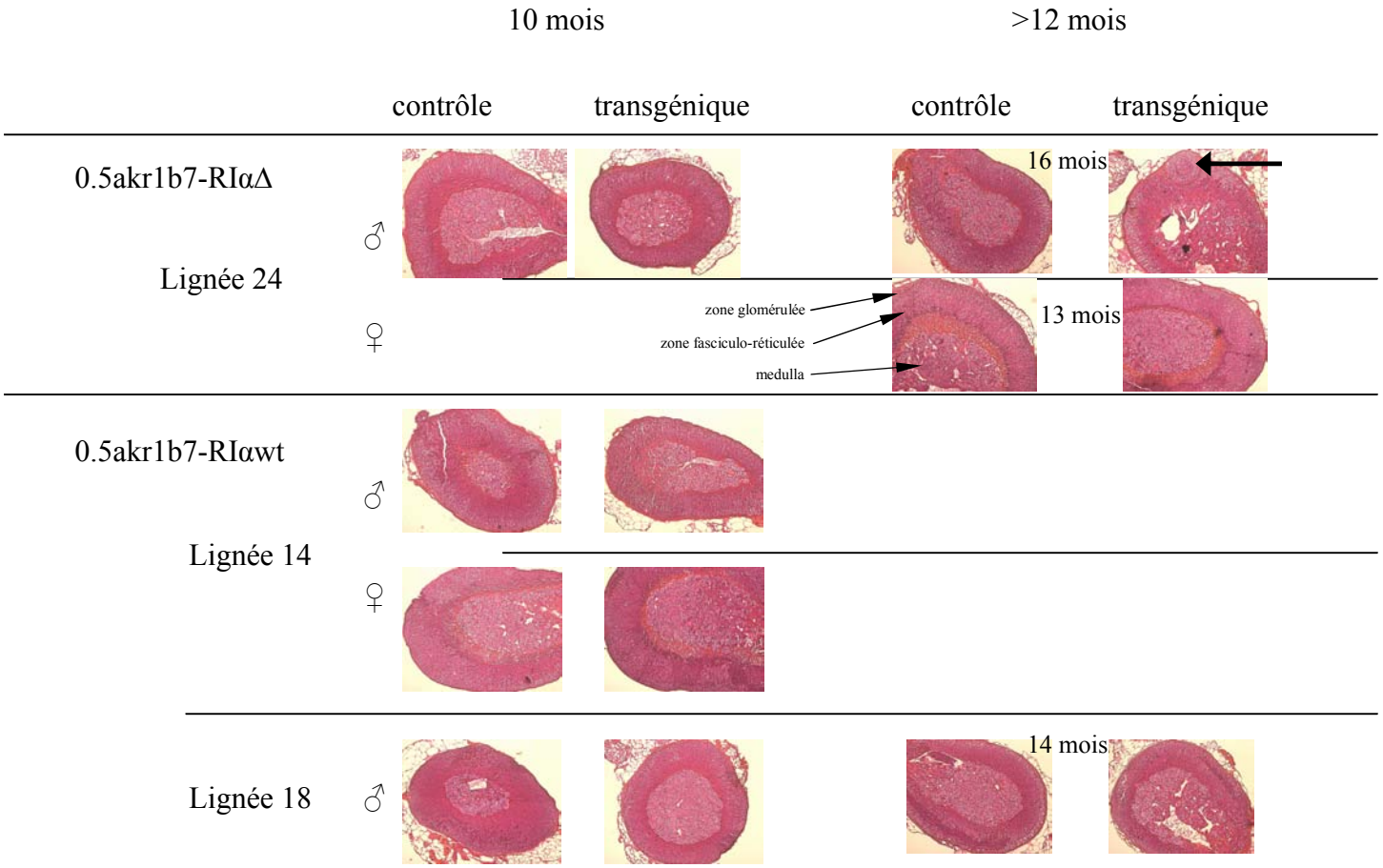


Figure III-8: **Coupes histologiques de surrénales d'animaux de différentes lignées transgéniques.**

Le nodule indiqué par la flèche n'est pas spécifique du phénotype puisque nous avons observé le même type d'anomalies chez des animaux non transgéniques (non montré).

De façon surprenante, nous observons une diminution de l'activité PKA libre et totale chez les animaux traités avec de l'ACTH par rapport à des animaux traités avec du sérum physiologique (Figure III-7-A et B). Cette observation va dans le même sens que la diminution de l'accumulation de la sous-unité catalytique (Caß) constatée dans des extraits de surrénales d'animaux traités avec de l'ACTH (Figure III-3,4 et 5).

Au vu de ces résultats, il est impossible de mesurer directement l'impact de RIa? sur l'activité PKA. En effet, l'expression basale du transgène étant très faible elle n'induit pas d'anomalies au niveau des sous-unités de la PKA et de la stéroïdogenèse. Il est donc nécessaire de stimuler son expression en traitant les animaux avec de l'ACTH pour obtenir après 12h des taux de RIa? équivalents à ceux de RIa endogène et un impact mesurable (↗RIIß, ↗StAR, ↗SR-BI, ↗AKR1B7, ↗corticostérone). L'augmentation de l'activité PKA en réponse à l'ACTH est certainement un phénomène rapide et transitoire et à 12h nous observons une sorte de désensibilisation de la voie PKA aussi bien chez des animaux sauvages que transgéniques (diminution de Caß et de l'activité PKA), masquant de ce fait l'effet de RIa? sur l'activité PKA. Pour contourner ce problème, nous devrons réussir à établir une expression suffisamment forte de RIa? en absence de traitements ACTH. Les moyens que nous envisageons sont présentés plus loin dans la discussion.

II.B.3. Analyses histologiques

Les coupes de surrénales d'animaux transgéniques exprimant la forme mutante RIa? ou sur-exprimant la forme sauvage RIawt (Figure III-8) ne montrent pas de modifications d'organisation et de structure du cortex surrénalien chez des animaux de 10 mois ou de plus d'un an. Le nodule chez l'animal fondateur de la lignée *akr1b7*-RIa? #24 (Figure III-8) ne semble pas être spécifique du génotype car nous avons observé des anomalies semblables chez des animaux contrôles non transgéniques (non montré).

III. Discussion

Pertinence du modèle de souris transgéniques (lignée *akr1b7*-RIa? #24) exprimant la protéine RIa? 184-236 avec la physiopathologie des PPNAD.

Les expériences de western-blots et de dosages de la corticostérone nous montrent que la signalisation PKA est perturbée chez les souris exprimant la forme mutante RIa?. En effet, la sensibilité des protéines StAR, AKR1B7 et SR-BI en réponse à l'ACTH est renforcée chez

les souris transgéniques ce qui conduit à élévation de la production de corticostérone. Ces résultats sont en accord avec les observations de Groussin *et al.* montrant que ce mutant agirait de manière trans-dominante (Groussin *et al.*, 2002b). Cet effet dominant négatif sur la protéine sauvage pourrait s'expliquer par la capacité de la protéine mutante à se lier aux sous-unités RIa formant ainsi des hétérodimères RIa/RIa? qui perdraient en partie ou en totalité leur capacité de liaison aux dimères de sous-unités catalytiques. En effet, la délétion 184-236 n'affecte pas le domaine de dimérisation des sous-unités régulatrices. Cependant aucune interaction physique entre RIa et RIa? n'a été démontrée à ce jour. Dans ce but, il serait intéressant de réaliser des expériences de GST-pulldown ou de développer un anticorps spécifique de la forme sauvage (dirigé contre la séquence en acides aminés codée par l'exon 6) pour réaliser des expériences de co-immunoprécipitation.

L'ensemble des résultats obtenus sont donc en accord avec le rôle transdominant attendu de la protéine RIa? démontré ici pour la première fois *in vivo* et suggère qu'elle est impliquée dans l'hyperactivité endocrine rencontrée chez les patients porteurs de cette mutation. Enfin, l'augmentation de 20% de l'accumulation de la protéine RIIß chez les animaux transgéniques exprimant la forme mutante RIa? est à rapprocher de ce qui est observé chez les malades atteints d'un CNC. En effet, des modifications d'équilibres entre les différentes sous-unités de la PKA avec comme conséquences une augmentation, d'une part, de la quantité de sous-unité RIIß et, d'autre part, du ratio PKA-II/PKA-I, ont été misent en évidence à la fois chez les patients mais aussi en partie dans le modèle de souris exprimant un antisens de *prkar1a* conduisant à la diminution d'environ 50% de RIa (Griffin *et al.*, 2004b).

Comment expliquer l'absence d'effet de la protéine mutante RIa? sur l'activité PKA ?

Les dosages de l'activité PKA surrénalienne libre ou totale n'ont pas montré de différences significatives chez les animaux qui expriment la forme mutante RIa? alors que les résultats obtenus en western-blots et par dosage de la corticostérone montrent qu'il existe vraisemblablement une stimulation de la voie de l'AMPc. Afin d'expliquer nos résultats, il est important de distinguer deux situations : en condition basale où le transgène est faiblement exprimé et sous ACTH où il est fortement exprimé.

Premièrement, en conditions basales, la faible expression du transgène conduit à une représentation de la protéine mutante RIa? très inférieure à celle de la protéine RIa sauvage. Cette faible représentation ne serait pas suffisante pour créer un déséquilibre et induire une augmentation de l'activité PKA.

Deuxièmement, les injections d'ACTH chez les animaux transgéniques ont pour but de stimuler l'expression du transgène et donc d'augmenter la quantité de RIa? au niveau surrénalien. L'accumulation maximale de la protéine RIa? a été obtenue après 12h de stimulation par l'ACTH. Dans ces conditions, la représentation relative des deux formes (sauvage et mutante) est comparable. Cette situation d'équilibre moléculaire correspond à ce qui est observé chez les patients qui présentent cette mutation (Groussin *et al.*, 2002b). L'effet dominant de RIa? peut alors se mettre en place et conduire à une augmentation de l'activité PKA par titration des sous-unités RIa sauvages. Cependant aucune modification de l'activité PKA libre ou totale n'est observée dans ces conditions chez les animaux transgéniques. La nécessité de stimuler l'expression du transgène par des injections d'ACTH induit une diminution de l'activité PKA libre et totale (Figure III-7) correspondant au moins à une diminution de l'accumulation des sous-unités catalytiques (Figure III-4 et 5). L'action de l'ACTH sur l'activité même de la PKA est un phénomène rapide qui est suivi d'une désensibilisation (Clark *et al.*, 2003). Une partie de ces mécanismes de désensibilisation pourraient aboutir à une diminution transitoire du nombre de sous-unités catalytiques. En effet, 36h après la stimulation ACTH les concentrations de Caß retrouvent des taux initiaux et ce phénomène est particulièrement marqué chez les animaux transgéniques (Figure III-5-C). Cette désensibilisation masquerait les effets de l'expression de RIa? sur l'activité PKA même.

Limites du modèle RIa?

Qu'elles sont les limites du modèle de la lignée *akr1b7*-RIa? #24 ? Cette question se pose puisque les animaux transgéniques obtenus expriment très faiblement le transgène en conditions basales ce qui ne semble pas affecter la voie de la PKA. Le modèle idéal serait des animaux exprimant la forme mutante à un niveau équivalent à la forme sauvage conduisant à l'installation d'une hypercorticostéronémie (syndrome de Cushing) et au développement de nodules tumoraux qui sont les 2 marques des PPNAD. Comme le montrent nos résultats nous sommes parvenus à un équilibre moléculaire RIa?/RIa et à reproduire l'hyperactivité endocrine à la condition de traiter les animaux transgéniques avec de l'ACTH. Comme les séquences régulatrices du gène *akr1b7* sont sensibles à la voie de la PKA, nous pouvons raisonnablement envisager qu'une fois l'équilibre entre forme sauvage et mutante de RIa sera durablement installé l'augmentation de l'activité PKA qui en résultera, permettera une auto-régulation du transgène *akr1b7*-RIa? en absence d'ACTH. Afin d'installer de façon durable un équilibre entre RIa? et RIa au sein du cortex surrénalien, nous envisageons de réaliser des

injections d'ACTH ou d'activateurs de la voie AMPc (8-bromo-AMPc, forskoline, IBMX) toutes les 24h à des souris transgéniques *akr1b7*-RIa? #24 pendant plusieurs semaines. Après cette période d'injections, nous pourrons contrôler par western blot si il y a maintien au cours du temps de l'expression de la protéine RIa? en absence d'ACTH. Parallèlement, nous avons lancé des croisements dans le but d'établir des souris homozygotes pour le transgène *akr1b7*-RIa?, ce qui devrait permettre une plus forte représentation de la protéine mutante au sein de la surrénale et donc d'accentuer les phénotypes mis en évidences dans notre modèle en favorisant notamment l'apparition de PPNAD. A ce jour, aucun des croisements n'a permis d'obtenir dans la descendance des animaux homozygotes pour le transgène et le nombre de petits par portée semble diminué. Ces premières observations suggèrent une mort *in utéro* des embryons, c'est ce que nous envisageons de rechercher rapidement en sacrifiant des femelles gestantes à différents stades du développement embryonnaire.

Poursuite des analyses.

Le statut hormonal des animaux *akr1b7*-RIa? a été en partie analysé. En effet, les dosages plasmatiques ont permis de mettre en évidence une plus forte production de corticostérone en réponse à l'ACTH chez les animaux transgénique exprimant RIa?. Nous devons poursuivre en déterminant les concentrations relatives de corticostérone et d'ACTH dans des conditions basales et après injection de dexaméthasone (dex). En effet, les patients atteints d'un PPNAD ont des taux d'ACTH très faible et peuvent présenter une réponse paradoxale à la dexaméthasone (Stratakis *et al.*, 1999). C'est-à-dire qu'en réponse à un tel traitement on observe une augmentation du cortisol plasmatique au lieu d'une diminution normalement attendue par l'inhibition de la synthèse d'ACTH au niveau hypophysaire.

La détermination des modifications de l'activité PKA surrénalienne doit également se poursuivre par différentes approches. En mesurant, directement l'activité des différentes holoenzymes I et II de la PKA afin de mettre en évidence, non seulement, des variations d'activité mais aussi des variations du ratio PKA-II/PKA-I qui est modifié chez les patients atteints du CNC (Griffin *et al.*, 2004b).

D'autre part, il est possible que les anomalies du gène *PRKAR1A* affectent d'autres voies de signalisations que celle de la PKA. En effet, il a été observé des altérations de la voie MAP-Kinase (ERK1/2) dans des cellules de patients présentant des mutations de *PRKAR1A* (Robinson-White *et al.*, 2003). Il serait donc intéressant de rechercher des modifications des niveaux de phosphorylations de ERK1/2 dans notre modèle transgénique.

Enfin, bien que les analyses histologiques menées jusqu'à ce jour n'aient pas permis de mettre en évidence d'anomalies, elles devront être poursuivies chez des animaux plus âgés et chez des souris dont l'expression du transgène aura été maintenue constitutive selon l'approche énoncée dans le paragraphe précédent ou chez les souris homozygotes si elles sont viables.

Les souris transgénique sur-exprimant la forme sauvage RIa-wt

Nous devrons apprécier de la même façon que pour les animaux exprimant RIa?, les effets de la sur-expression de RIa-wt sur l'activité PKA, les gènes sensibles à la voie PKA et sur la production de corticostérone.

Matériels et Méthodes

Construction des plasmides

Les plasmides 0,5*akr1b7*-IGF2/p57AS/RIawt/RIa? (AS pour anti-sens) ont été construits à partir du plasmide 0,5*akr1b7*-CAT-Int conçu au laboratoire pour de précédentes expériences de transgenèse additive à partir du plasmide pBLCAT3 (Martinez *et al.*, 1999).

La construction 0,5*akr1b7*-CAT-Int contient le fragment -510/+41 du gène *akr1b7* fusionné à un rapporteur composé de la séquence codante de la protéine CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase), du mini-intron et du signal de polyadénylation de l'antigène T du SV40 (Simian Virus). Ces séquences sont suivies d'un fragment intragénique de *akr1b7* de 3,5 kilobases cloné en position inverse qui augmente la fréquence et le taux d'expression du transgène (Martinez *et al.*, 1999).

Les plasmides *CYP11A1*-IGF2/p57AS ont été construits à partir du plasmide pBLCAT3 (Luckow and Schutz, 1987). Le plasmide pBLCAT3 contient le gène rapporteur CAT suivie du mini-intron et du signal de polyadénylation de l'antigène T du SV40 (Simian Virus).

Les plasmides p*CMV*-IGF2/p57AS/p57S (S pour sens) ont été construits à partir du plasmide pCR3 (Invitrogen) qui contient le promoteur du CMV (Cytomegalovirus).

Oligonucléotides utilisés pour construire les plasmides

1	IGF2m/ATG/xhoI	Direct	5'-CCCTCGAG**ACCATGG**GGATCCCAGTG-3'
2	IGF2m/Stop/ScaI	Retour	5'-AAAGTACTTTT**TCA**CTGATGGTTGCTGGAC-3'
3	CYP11A1/-4400/XbaI	Direct	5'-GCTCTAGAGCGACCCCTCCCAAGGCCAAACAAA-3'
4	CYP11A1/+55/XhoI	Retour	5'-CCCTCGAGGGCCCACAGCTGTGACTGTAC-3'
5	IGF2/ATG/EcoRI	Direct	5'-GGAATTC**ACCATGG**GGATCCCAGTGGG-3'
6	pBL/SV40/XhoI	Retour	5'-CCCTCGAGGATCGATCCAGACATGA-3'
7	RIa/ATG/XhoI	Direct	5'-CCTCGAG**ACCATGG**AGTCTGGCAGTACCG-3'
8	RIa/Stop/ScaI	Retour	5'-AAAGTACT**TCA**GACAGACAGTGACACAAAAC-3'

Les séquences correspondant aux sites d'initiation et de terminaison de la traduction son représentées en gras et les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont soulignées.

Construction des plasmides 'IGF2' : 0,5*akr1b7*-IGF2, *CYP11A1*-IGF2 et p*CMV*-IGF2

Le gène *cat* a été excisé des plasmides 0,5*akr1b7*-CAT et pBLCAT3 par digestion NcoI suivie d'une réaction de comblement des extrémités cohésives (NcoI-lisse) par le fragment de Klenow puis par une digestion XhoI.

Des ARN totaux de foie foetal de souris ont été rétro-transcrits par la MMLV (Murine Moloney Leukemia Virus) puis les ANDc obtenus ont été amplifiés par PCR à l'aide des oligonucléotides 1 et 2 pour obtenir la partie codante d'IGF2 (position 1126 à 1668 de la séquence NM_010514.2). Ces oligonucléotides contiennent en plus des séquences homologues à IGF2 respectivement les sites XhoI et ScaI. Le fragment de PCR a ensuite été cloné dans le plasmide pGEM-T easy (Promega). L'insert IGF2 a été exicé du pGEM-T easy par les enzymes de restriction XhoI et ScaI puis inséré dans les sites XhoI/NcoI-lisse des vecteurs 0,5*akr1b7*-~~CAT~~ et pBL~~CAT3~~ afin d'obtenir les nouvelles constructions **0,5*akr1b7*-IGF2** et pBL-IGF2.

Les séquences régulatrices -4400/+55 du gène *CYP11A1* ont été obtenues à partir d'ADN génomique humain préalablement digéré par l'enzyme de restriction EcoRI. Les oligonucléotides 3 et 4 utilisés pour amplifier par PCR (à l'aide de la polymérase Herculase, Stratagene) ces séquences régulatrices sont représentées dans le tableau ci-dessus. Le fragment de PCR obtenu a été cloné dans le plasmide pGEM-T easy. Les séquences -4400/+55 de *CYP11A1* ont été ensuite isolées par une double digestion XhoI/XbaI puis inséré dans le plasmide pBL-IGF2 ayant été ouvert par la même digestion (XhoI/XbaI) afin d'obtenir le plasmide ***CYP11A1*-IGF2**.

IGF2 et les séquences du mini-intron et du signal de polyadénylation de l'antigène T du SV40 ont été amplifiés par PCR (oligonucléotides 5 et 6) à partir du plasmide *0,5akr1b7*-IGF2. Les produits de PCR ont subit une double digestion EcoRI/XhoI puis ont été insérés dans le plasmide pCR3 ayant été ouvert par les mêmes enzymes de restrictions afin d'obtenir le nouveau plasmide **p*CMV*-IGF2**.

Construction des plasmides 'p57' : 0,5*akr1b7*-p57AS, *CYP11A1*-p57AS, p*CMV*-p57AS (antisens) et p*CMV*-p57 (sens).

Le gène *cat* a été excisé des plasmides 0,5*akr1b7*-CAT et pBLCAT3 par digestion NcoI et BglII suivie d'une réaction de comblement des extrémités cohésives (NcoI lisse et BglII lisse) par le fragment de Klenow. Le plasmide pCR3 a été ouvert par l'enzyme de restriction EcoRV.

L'ADNc complet de $p57^{kip2}$ murin a été isolé à partir du plasmide pBS-mp57 (fourni par le Dr P. Zhang, Baylor College of medecine, Houston, Tx) par une digestion XhoI suivi d'une réaction de comblement des extrémités cohésives par le fragment de Klenow. L'insert $p57^{kip2}$ XhoI-lisse/XhoI-lisses a ensuite été inséré dans les sites BglII-lisse/NcoI-lisse des vecteurs 0,5*akr1b7*-~~CAT~~ et pBL~~CAT3~~ et dans le site EcoRV du plasmide pCR3 afin d'obtenir

respectivement les nouvelles constructions **0,5*akr1b7*-p57AS**, pBL-p57AS (anti-sens), **p*CMV*-p57AS** (anti-sens) et **p*CMV*-p57S** (sens).

Le plasmide pBL-p57AS a été ouvert par une double digestion XhoI/XbaI afin d'insérer les séquences régulatrices -4400/+55 *CYP11A1* et d'obtenir le nouveau plasmide ***CYP11A1*-p57AS**.

Construction des plasmides 'RIa' 0,5*akr1b7*-RIawt et 0,5*akr1b7*-RIa? .

Les parties codantes de RIawt et RIa? ont été amplifiés respectivement à partir des plasmides pGEMT- RIawt et pGEMT- RIa? (fournis par le Pr J. Bertherat, Institut Cochin, Paris) à l'aide des oligonucléotides 7 et 8. Les produits de PCR ont été digérés par les enzymes de restriction XhoI et ScaI afin d'être inséré dans les sites XhoI/NcoI-lisse du vecteurs 0,5*akr1b7*-~~CAT~~ pour obtenir les constructions **0,5*akr1b7*-RIawt** et **0,5*akr1b7*-RIa?** .

Transfections transitoires et stables

Pour tester l'efficacité des différentes constructions les cellules Hela et ATC1 ont été transfectées 16h après leur ensemencement à une densité de 400000 cellules par boite de 6 cm à l'aide de l'Exgen 500 (Euromedex) (4µL/µg d'ADN). Puis, afin de tester le contrôle hormonal de certaines de ces constructions, les cellules ont été traitées avec de l'ACTH (fragment 1-24, Sigma).

Pour sélectionner les cellules ayant inséré de façon stable les constructions p*CMV*-IGF2 et p*CMV*-p57AS, les cellules ATC ont été cultivées en présence de néomycine (G418 400µg/ml) pendant plusieurs semaines après transfection et les différents clones ont été isolés par dilution limite.

Préparation des fragments pour la transgenèse

Les constructions destinées à la transgenèse ont été linéarisées et débarrassées des séquences plasmidiques à l'aide des enzymes de restrictions indiquées ci-dessous puis préparées selon les méthodes classiques de trangenèse additive (Hogan *et al.*, 1986) afin d'être micro-injectées dans des ovocytes fécondés de souris.

0,5*akr1b7*-IGF2 : KpnI et HindIII

CYP11A1-IGF2 : EcoRI et SalI

0,5*akr1b7*-p57AS : KpnI et PvuI

CYP11A1-p57AS : EcoRI et SalI

0,5*akr1b7*-RIawt : KpnI et HindIII

0,5*akr1b7*-RIa? : KpnI et HindIII

Liste des anticorps utilisés

anticorps	origine animale	fournisseur	dilution
$p57^{KIP2}$ (06-556)	polyclonal de lapin purifié	Upstate Biotechnology	1/1000
CDK2 (M2)	polyclonal de lapin purifié	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
CDK4 (C-22)	polyclonal de lapin purifié	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
p27 (C-19)	polyclonal de lapin purifié	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
IGF2 (S1F2)	monoclonal de souris purifié	Upstate Biotechnology	1/1000
RIa (clone 20)	monoclonal de souris purifié	BD Sciences	1/500
RIIa (clone 40)	monoclonal de souris purifié	BD Sciences	1/1000
RIIß (clone 54)	monoclonal de souris purifié	BD Sciences	1/1000
Caß (clone 5B)	monoclonal de souris purifié	BD Sciences	1/1000
AKR1B7 (IL3)	polyclonal de lapin (sérum)	Lefrancois-Martinez *et al*., 2004	1/3000
StAR	polyclonal de lapin (sérum)	Dr. D. Stocco, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock	1/2000
SR-B1	polyclonal de lapin (sérum)	Dr. A. Mazur, CNRH, INRA, Theix	1/2000
ß-ACTINE	polyclonal de lapin purifié	Sigma-Aldrich	1/2000

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous nous sommes essentiellement attachés à développer et à caractériser de nouveaux modèles cellulaires et animaux. Ceci dans le but premièrement, d'obtenir de nouvelles lignées cellulaires cortico-surrénaliennes présentant une meilleure différenciation que les cellules Y1 et H295 et deuxièmement, afin d'essayer de comprendre le déroulement du processus tumoral dans la cortico-surrénale en testant l'implication de gènes candidats au développement de cortico-surrénalomes (IGF2 et $p57^{KIP2}$) ou d'un type particulier de tumeurs bénignes, les PPNAD (RIa).

Les cellules ATC

Les mécanismes impliqués dans la régulation d'une des fonctions physiologiques principales de la cortico-surrénale, la stéroïdogenèse, ont été essentiellement analysés jusqu'à présent grâce à deux modèles cellulaires issus de tumeurs spontanées, les cellules murines Y1 et les cellules humaines H295. Ces cellules, comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, ont permis d'importantes avancées sur la compréhension des mécanismes qui contrôlent la stéroïdogenèse mais elles ne présentent pas un phénotype complètement différencié. En effet, soit elles ont perdu d'importantes fonctions soit elles cumulent les caractéristiques phénotypiques de différents types cellulaires stéroïdogènes. Plusieurs équipes ont utilisé l'oncogenèse ciblée chez la souris pour tenter d'obtenir des lignées cellulaires du cortex surrénalien présentant un meilleur état de différenciation. Cependant, les cellules obtenues ne possèdent pas un phénotype complet de cellules d'une des zones du cortex surrénalien, en particulier de la zone fasciculée. De plus, elles présentent des défauts de sensibilité à l'ACTH et de production de corticostérone. Les lignées cellulaires ATC assurent la synthèse du glucocorticoïde terminal de la zone fasciculée murine (corticostérone) et cette production est sensible à des doses physiologiques d'ACTH. Ces cellules affichent donc un phénotype de cellules de la zone fasciculée et malgré l'expression de l'oncogène AgT, l'absence d'expression d'IGF2 et de GATA4 et le maintien de l'expression de $p57^{KIP2}$ et de GATA6 permet de supposer qu'elles sont issues d'une tumeur bénigne.

Nous avons donc à disposition un modèle cellulaire très différencié, qui nous a permis de montrer qu'en réponse à l'induction d'ACTH, l'accumulation de SF-1 est augmentée alors que celle de son antagoniste DAX-1 est diminuée. Ces observations ont été confirmées également *in vivo* chez la souris. De plus, nous avons corrélé les variations du ratio SF-1/DAX-1 à l'expression de leurs gènes cibles impliqués dans la stéroïdogenèse. Le mécanisme conduisant à la diminution de DAX-1 reste à préciser. En effet, il semble que les

effets de l'ACTH ne soient pas transcriptionnels mais qu'ils impliquent un intermédiaire protéique non identifié qui pourrait par exemple diminuer la stabilité des ARNm *dax-1*.

La tumorigenèse cortico-surrénalienne

Le développement des tumeurs de la cortico-surrénale est méconnu et il est parfois difficile de distinguer celles qui sont bénignes de celles qui ne le sont pas. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si ce processus tumoral est progressif ou non. En effet, certaines anomalies ne sont retrouvées que dans les tumeurs bénignes et pas dans les cortico-surrénalomes. De plus, nous ne connaissons pas exactement l'implication et le rôle des anomalies moléculaires qui sont décrites dans ces différentes tumeurs cortico-surrénaliennes. Au cours de cette thèse, nous avons voulu tester *in vivo* chez la souris l'implication de certaines de ces anomalies génétiques fréquemment retrouvées chez l'homme 1) dans les PPNAD qui touchent l'expression du gène codant RIa et 2) dans les cortico-surrénalomes qui touchent l'expression des gènes codant IGF2 et $p57^{KIP2}$.

<u>RIa et PPNAD</u>

Le gène *PRKAR1A* est il un gène suppresseur de tumeur ?

Un gène suppresseur de tumeur, à la différence d'un oncogène, fonctionne généralement de façon récessive, et exige la perte des deux allèles pour conduire au développement tumoral, l'haploinsuffisance n'étant qu'un état de prédisposition à ce développement.

L'implication de *PRKAR1A* en tant que suppresseur de tumeur n'est pas très claire. En effet, bien que des mutations inactivatrices et des pertes d'hétérozygotie (LOH) soient observées pour le locus de ce gène dans certaines tumeurs (Kirschner *et al.*, 2000), dans d'autres, il semble que l'haploinsuffisance seule soit responsable du développement tumoral (Bertherat *et al.*, 2003; Tsilou *et al.*, 2004). D'ailleurs, jusqu'à la découverte des mutations inactivatrices dans le syndrome de Carney (Kirschner *et al.*, 2000), on attribuait plutôt à *PRKAR1A* un rôle de proto-oncogène. En effet, dans plusieurs tumeurs et dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs, sa forte expression est associée à des capacités prolifératives élevées (Bold *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1995). Il semble donc que *PRKAR1A* ne soit pas un gène suppresseur de tumeur classique.

Les animaux transgéniques (*akr1b7*-RIa?) exprimant la forme mutante RIa? nous ont permis de montrer que cette mutation peut être responsable d'une hyperactivité endocrine et donc certainement du syndrome de Cushing des patients qui présentent cette mutation

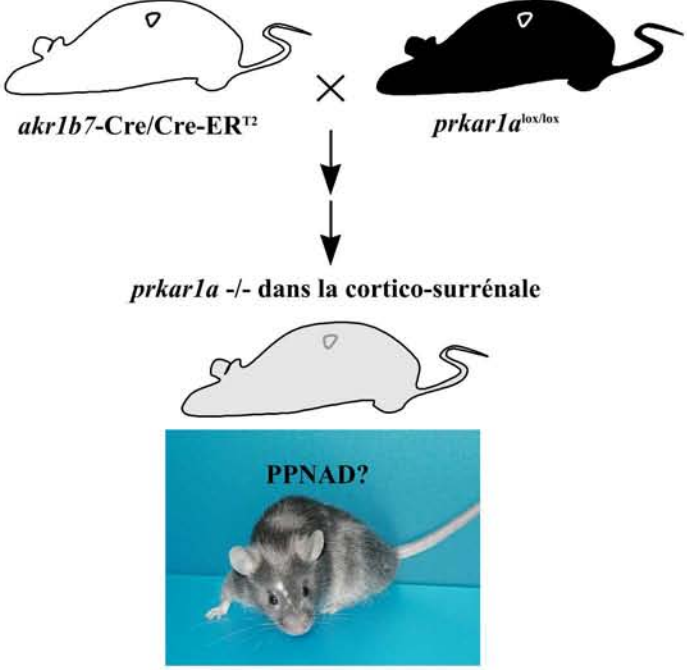


Figure A: Invalidation conditionnelle de *prkar1a* dans le cortex surrénalien.

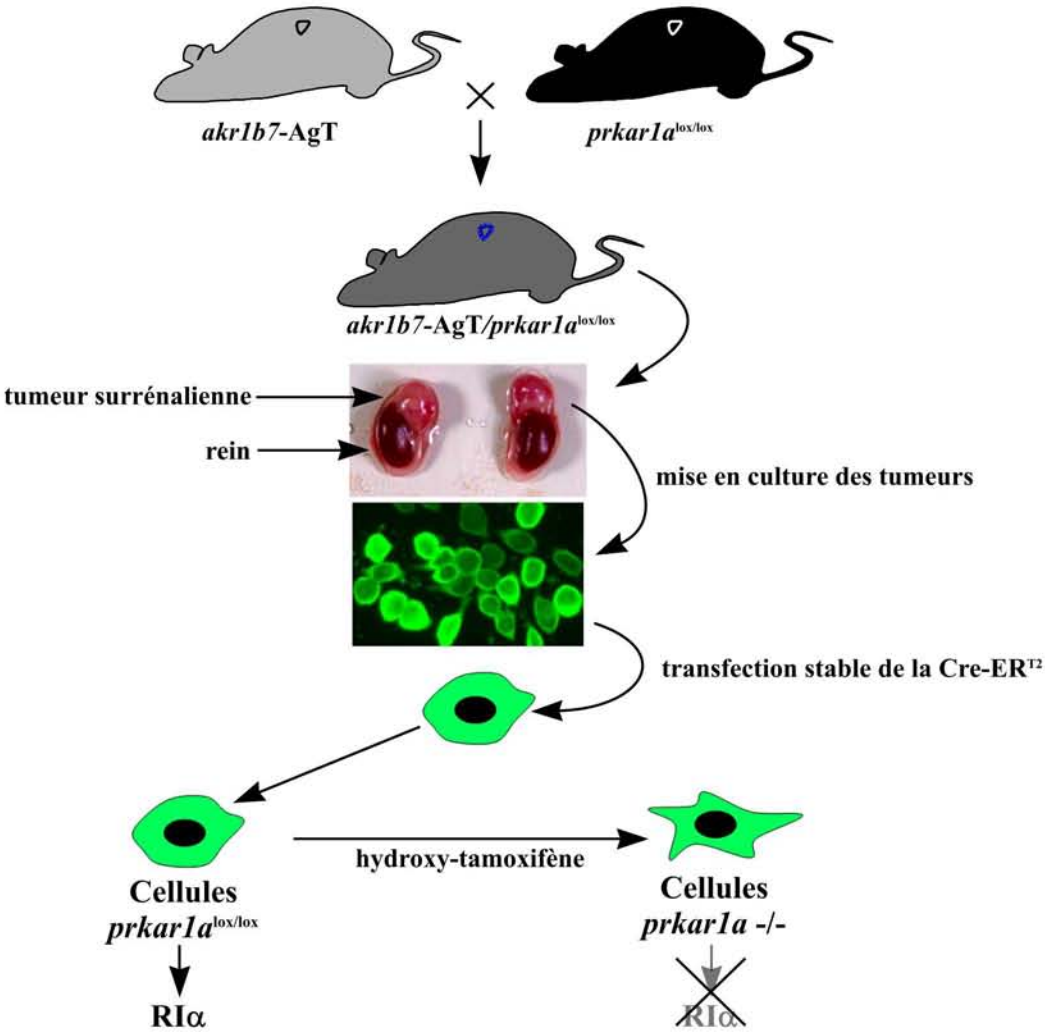


Figure B: Développement de lignées cellulaires déficientes en RIα grâce aux souris *akr1b7*-AgT et au système Cre/Lox.

particulière. A l'heure actuelle, nous n'avons pas observé d'anomalies histologiques au niveau de la cortico-surrénale chez ces animaux. Cela peut signifier que cette mutation à elle seule ne permet pas le développement des PPNAD mais simplement l'hyperactivité endocrine. Pour savoir si tel est le cas ou si la dérégulation de la voie PKA, suite à l'expression du transdominant RIa?, est responsable de l'apparition de signes tumoraux, il nous faut maintenir l'expression de cette sous-unité mutante dans le cortex surrénalien au même niveau que la forme sauvage en rendant constitutive l'expression du transgène (voir Résultats-3ème Partie-III-Discussion).

Le modèle représenté par les animaux *akr1b7*-RIa? n'illustre qu'un seul des deux types d'atteintes fonctionnelles de RIa rencontrés dans les PPNAD. C'est-à-dire l'expression d'une protéine tronquée qui possède un rôle transdominant et qui est détectée dans les tumeurs sans perte allélique associée. Le deuxième type d'atteinte de RIa, bien plus fréquent, conduit à des mutations inactivatrices associées à des pertes de l'allèle sain. Nous envisageons d'invalider le gène *prkar1a* spécifiquement dans le cortex surrénalien en utilisant le système Cre/LoxP (Figure A). Les souris exprimant spécifiquement la recombinase Cre ou la Cre inductible par l'hydroxy-tamoxifène (Cre-ER^{T2}) dans le cortex surrénalien sous le contrôle des séquences régulatrices du gène *akr1b7* sont en cours de caractérisation au laboratoire (Lambert-Langlais S, projet de thèse) et les souris dont le gène *prkar1a* a été flanqué de site LoxP (*prkar1a*$^{lox/lox}$) par recombinaison homologue nous ont été fournies par les Dr LS Kirschner et CA Stratakis (Kirschner *et al.*, 2005). Ce modèle a pour but de tester la capacité des mutations inactivatrices de *prkar1a* à induire la tumorigenèse et l'hyperactivité endocrine, mais aussi de savoir si ce gène dans la surrénale est un suppresseur de tumeurs.

Un autre projet en cours au laboratoire vise à développer des lignées cellulaires déficientes pour RIa de manière inductible. Nous avons lancé des croisements entre les souris *akr1b7/AgT* et les souris *prkar1a*$^{lox/lox}$. Cela nous permettra d'introduire dans les tumeurs du cortex surrénalien induites par l'AgT les deux allèles « floxés » de *prkar1a*. Ainsi, les lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs auront certainement un phénotype aussi bien différencié que celui des cellules ATC et pourront être invalidées pour le gène *prkar1a* en apportant la recombinase Cre inductible par l'hydroxy-tamoxifène (Figure B). Ces cellules fourniront un modèle *ex vivo* permettant d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la transformation induite par l'inactivation du gène *prkar1a*. La protéine RIa est associée aux microtubules à toutes les étapes du cycle cellulaire (Imaizumi-Scherrer *et al.*, 2001), semble impliquée dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose et permet, par ses contacts avec les protéines AKAPs, d'adresser la PKA-I vers divers compartiments cellulaires. Des

lignées cellulaires dépourvues d'activité RIa constitueraient un outil précieux pour explorer dans le cadre d'une situation pathologique (la PPNAD) son implication dans la mitose, dans la localisation et le trafic cellulaire de la PKA. Enfin, ces cellules permettront d'identifier, par des analyses comparées du transcriptome ou du phosphoprotéome des cellules cortico-surénalienne *prkar1a*$^{-/-}$ et *prkar1a*$^{lox/lox}$, les voies de signalisations perturbées par l'invalidation de RIa.

Les cortico-surrénalomes.

Les altérations génétiques et/ou épigénétiques dans la région 11p15 sont les anomalies le plus constamment retrouvées dans les tumeurs malignes du cortex surrénalien. Cela conduit fréquemment à une sur-expression d'IGF2 et à une perte de p57^{KIP2}. Les investigations que nous avons menées *in vitro* et *in vivo* nous laisse supposer que ces anomalies prises individuellement ne sont pas capables d'initier le développement tumoral au niveau des cellules cortico-surrénaliennes.

Le développement tumoral de la cortico-surrénale nécessite peut-être la dérégulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différentes fonctions et voies de signalisation. Il est important d'explorer toutes les pistes qui semblent dérégulées dans les tumeurs afin de mieux caractériser les processus tumoraux mis en jeu au niveau de la cortico-surrénale, mais aussi pour avoir des marqueurs de malignité qui permettront une meilleure prise en charge des patients.

Des facteurs normalement exprimés dans le cortex surrénalien peuvent être altérés dans ces tumeurs, c'est le cas par exemple de gènes impliqués dans la stéroidogenèse. La perte des fonctions différenciées d'un tissu est généralement associée à la transformation tumorale. Les cortico-surrénalomes ayant majoritairement une faible activité endocrine, les profils d'expression de ces gènes pourraient servir de marqueurs de l'état de différenciation et donc de malignité de la tumeur. Certains de ces gènes ont leur expression diminuée dans les cortico-surrénalomes. C'est le cas de *StAR* et *CYP11A1*. Cependant, il est impossible d'associer ces anomalies d'expression à l'état endocrine des tumeurs (de Fraipont *et al.*, 2005; Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004; Zenkert *et al.*, 2000). Il est à noter aussi que d'autres auteurs n'observent pas de variation d'expression de *StAR* entre des adénomes et des cortico-surrénalomes (Liu *et al.*, 1996). D'autres gènes dont les produits sont directement impliqués dans la stéroidogenèse, comme *CYP17*, *CYP21A2*, *CYP11B1*, ont aussi, d'une manière générale, une expression plus faible dans les cortico-surrénalomes (de Fraipont *et al.*, 2005; Giordano *et al.*, 2003). Mais comme pour *StAR* et *CYP11A1*, leurs profils d'expression

peuvent difficilement être corrélés aux capacités de synthèse des tumeurs. Notre équipe s'est intéressée à un autre acteur impliqué dans la stéroidogenèse surrénalienne, *AKR1B1*. AKR1B1 appartient à la famille des aldoses réductases (Hyndman *et al.*, 2003) et participe au métabolisme du glucose, à l'osmorégulation et a un rôle protecteur contre des aldéhydes toxiques pour les cellules en prenant en charge par exemple l'isocaproaldéhyde, issu du clivage du cholestérol par CYP11A1 lors de la stéroidogenèse (Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004; Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999; Matsuura *et al.*, 1996). Il a été montré par northern et western blot qu'*AKR1B1* est beaucoup plus faiblement exprimé dans les cortico-surrénalomes par rapport aux tumeurs bénignes (Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004). Il est à noter que parmi les 5 gènes testés lors de cette étude (*AKR1B1*, *StAR*, *CYP11A1*, *SF-1* et *DAX-1*) seule l'expression d'*AKR1B1* est significativement réduite dans les cortico-surrénalomes. Ces résultats suggèrent que la chute de l'expression de *AKR1B1* pourrait constituer un indice de malignité.

Récemment, afin de mieux comprendre les évènements génétiques qui contribuent de façon significative à la progression tumorale de la cortico-surrénale, deFraipont et al. ont évalué l'expression de 230 gènes candidats par microarrays dans une série de 57 tumeurs cortico-surrénaliennes (33 adénomes et 24 carcinomes). Ils ont identifié deux ensembles de gènes (l'ensemble « IGF2 » contenant le gène *IGF2* et 7 autres gènes ; et l'ensemble « stéroïdogenèse » comprenant 14 gènes dont 6 codant des protéines directement impliquées dans la stéroidogenèse) qui semblent être des marqueurs prédictifs de malignité aussi fiables que le score de Weiss et qui permettent de différencier les adénomes des cortico-surrénalomes (de Fraipont *et al.*, 2005). De plus, un groupe de 14 gènes permet de différencier cortico-surrénalomes métastatiques de cortico-surrénalomes non-métastatiques. Les résultats de cette analyse vont dans le même sens qu'une autre étude par microarray à plus grande échelle (environ 10500 gènes) qui a été effectuée peu avant (Giordano *et al.*, 2003).

Les anomalies fréquemment retrouvées dans les cortico-surénalomes, surexpression d'IGF2 et perte de l'inhibiteur de cycline/CDK $p57^{KIP2}$, s'accompagnent d'une activité accrue des complexes cycline-CDK de transition G1/S due à une élévation des taux de cycline E et des CDK2 et 4 (Bourcigaux *et al.*, 2000). Des analyses immunohistochimiques récentes, réalisées sur une série de 57 tumeurs cortico-surrénaliennes, ont montré que l'augmentation d'expression de la cycline E est associée à un phénotype malin et qu'elle est fortement corrélée à la taille de la tumeur. La surexpression de la cycline E dans les tumeurs cortico-surrénaliennes est donc un marqueur de pronostic défavorable (Tissier *et al.*, 2004).

L'altération des fonctions de p53 dans les différents cancers a permis de constater son rôle aussi bien dans le contrôle de la croissance cellulaire, dans l'apoptose, dans le contrôle de l'intégrité du génome que dans la réparation de l'ADN (Levine, 1997). Dans les cortico-surénalomes, seulement 30 à 50% des patients présentent des mutations de *TP53*. Ces mutations sont rarement détectées dans les stades précoces de la tumorigenèse, suggérant qu'elles surviennent plus tardivement en conséquence à d'autres évènements oncogéniques (Ohgaki *et al.*, 1993; Reincke *et al.*, 1994; Wachenfeld *et al.*, 2001). Une incidence bien plus élevée de cortico-surrénalomes chez l'enfant dans le sud du Brésil, associée à une mutation germinale particulière de *TP53* (R337H), a été décrite. Trente cinq des 36 enfants brésiliens présentant des tumeurs de la cortico-surrénale avaient cette mutation particulière (Ribeiro *et al.*, 2001). Cette mutation a ensuite été retrouvée plus tard chez d'autres enfants et patients brésiliens adultes (Latronico *et al.*, 2001). L'hypothèse actuelle concernant cette mutation de P53 est qu'elle engendrerait une déstabilisation du domaine de tétramérisation de la protéine aux conditions de pH rencontrées spécifiquement à certains stades du développement de la surrénale (DiGiammarino *et al.*, 2001). Des résultats récents montrent une perte allélique de l'allèle sauvage et une accumulation anormale de la protéine mutante dans les tumeurs cortico-surrénaliennes, alors que P53 n'est pas détectable en immunohistochimie dans le tissu sain ou dans les adénomes du cortex surrénalien (Bernini *et al.*, 2002b; Longui *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2001). Cette mutation, puis la perte d'hétérozygotie pour *TP53*, causerait une instabilité génomique conduisant ainsi au développement tumoral. Il a ainsi été mis en évidence dans ces tumeurs de l'enfant une amplification du locus contenant le gène *SF-1*, associée à la présence du mutant P53(R337H) (Figueiredo *et al.*, 2005), qui suggère une participation de SF-1 à l'acquisition de propritétés prolifératives ou anti-apoptotiques.

La dérégulation de l'angiogenèse est une étape essentielle de la progression et de la croissance tumorale et c'est probablement un événement requis dès les stades pré-malins (Turner *et al.*, 2003). Le maintien d'une vascularisation organisée du cortex surrénalien est fondamental pour sa fonction endocrine puisque chaque cellule est en contact direct avec un capillaire fenestré. Alors que dans les tumeurs bénignes l'organisation des réseaux de capillaires est identique à celle du tissu sain, les cortico-surrénalomes présentent une vascularisation désorganisée (Magennis and McNicol, 1998). Différentes études montrent une forte augmentation de l'expression du facteur angiogénique VEGF-A et une diminution du facteur angiostatique, thrombospondine (TSP1), dans les cortico-surrénalomes par rapport aux tumeurs bénignes (Bernini *et al.*, 2002a; de Fraipont *et al.*, 2000). Dans ces tumeurs, ces variations d'expression sont corrélées à la sur-expression d'IGF2. Il est intéressant de noter

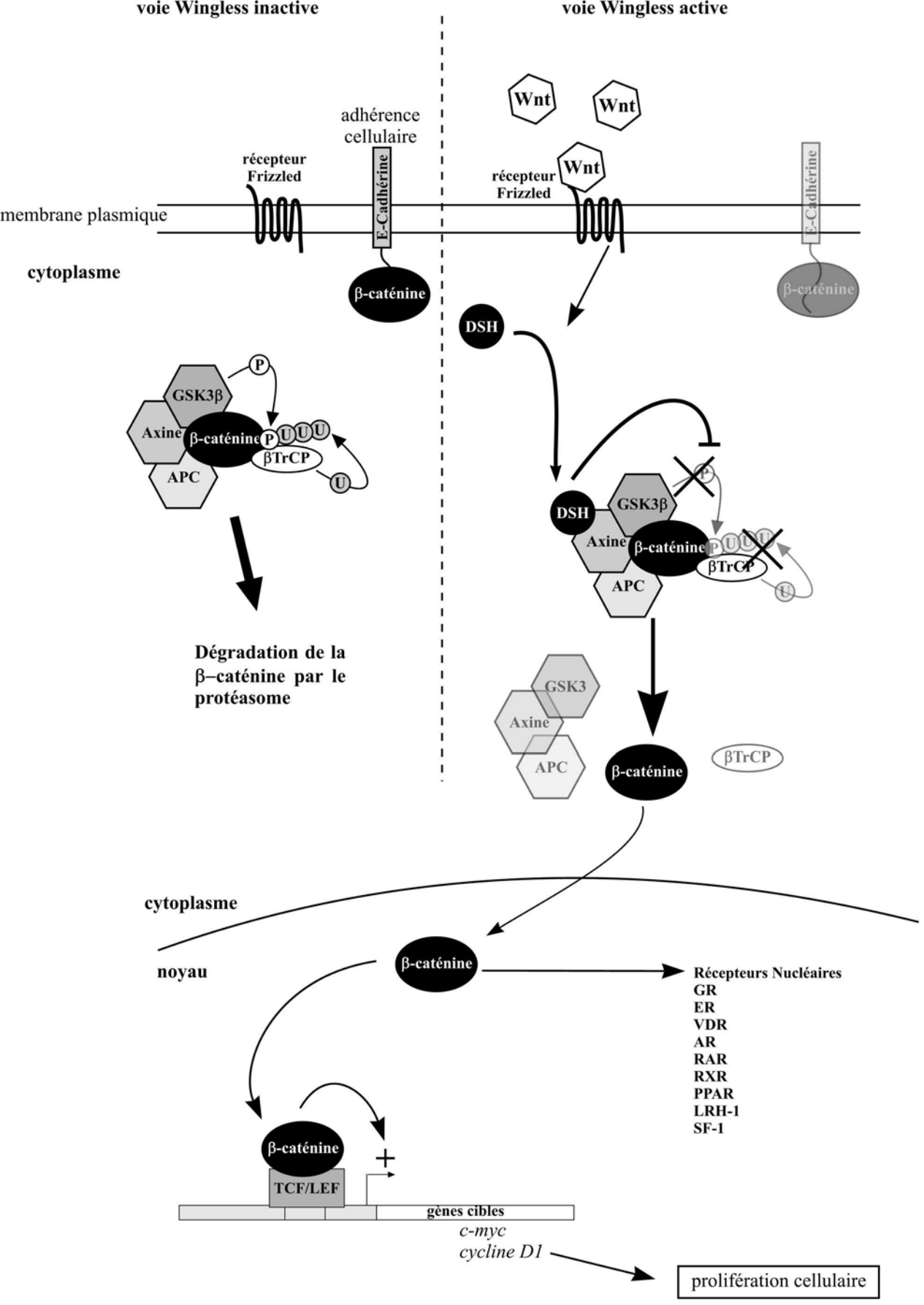


Figure C: La voie de signalisation Wnt/β-caténine (Wingless).
En absence de stimulation par Wnt, la β-caténine associée au complexe APC/GSK3β/βTrCP, est phosphorylée, ubiquitinée et dégradée par le protéasome. L'activation par Wnt permet à la β-caténine d'échapper à sa dégradation, de s'accumuler dans le cytoplasme et d'aller dans le noyaux pour exercer un rôle de co-activateur de la transcription de divers gènes.

que, dans les hépatocytes et les kératinocytes, IGF2 stimulerait l'expression de VEGF en empruntant les voies de signalisation ERK1/2 et PI3-kinase (Kim and Kim, 2005; Kim *et al.*, 1998). Ainsi, il y a un lien possible entre les anomalies génétiques rencontrées dans des tumeurs cortico-surrénaliennes conduisant à la sur-expression d'IGF2 et l'angiogenèse.

La voie Wnt/ß-caténine, une nouvelle piste dans le développement des tumeurs cortico-surrénaliennes.

Les premiers rôles de la voie Wnt (wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family) ont été découverts à la suite d'analyses génétiques concernant la signalisation *wingless* au cours du développement embryonnaire de la drosophile, notamment pour son implication dans la mise en place de la polarité des segments de l'embryon. La transduction du signal Wnt s'est également avérée être impliquée dans le développement de l'axe dorsal chez le xénope. Les voies de signalisation empruntées dans ces deux modèles montrent de grandes similitudes, menant à un mécanisme général d'activation. Les protéines Wnts (au moins 19 membres chez l'homme et la souris), codées par les proto-oncogènes *Wnts*, sont des glycoprotéines qui, lorsqu'elles sont sécrétées, exercent leurs effets sur les cellules environnantes en se fixant sur des récepteurs à 7 domaines transmembranaires appartenant à une famille nommée Frizzled (Figure C). La signalisation Wnt peut être vue comme un système à deux états : un état non stimulé et un état stimulé par le facteur de croissance Wnt. En absence de stimulation par Wnt, le pool de ß-caténine cytoplasmique est épuisé par l'action d'un complexe protéique associant la ß-caténine à au moins trois autres protéines, APC (Adenomatous Polyposis Coli), l'axine (une protéine adaptatrice) et la GSK3ß (sérine-thréonine glycogène synthase kinase 3 ß). Cette dernière phosphoryle la ß-caténine permettant le recrutement de ßTrCP (ß Transducin Repeat Containing Protein) (Winston *et al.*, 1999), une protéine initiatrice du processus d'ubiquitination et de dégradation de la ß-caténine par le protéasome (Aberle *et al.*, 1997). La ß-caténine est ainsi maintenue à une faible concentration dans le cytoplasme, l'empêchant de rejoindre le noyau (pour revue : (Miller, 2002)). Lorsqu'un signal mitotique est délivré par l'activation de Wnt, via son récepteur Frizzled, la GSK3ß est inhibée par la protéine DSH (Disheveled) et la ß-caténine, n'étant plus phosphorylée, n'est plus dégradée. La concentration cytoplasmique de la ß-caténine augmente, puis elle va pouvoir passer dans le noyau. Elle joue alors le rôle de protéine co-activatrice en se liant à des facteurs de transcription comme les facteurs TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor). Ceci conduit à l'expression de plusieurs gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire comme *C-MYC* et la *Cycline D1* (vous trouverez sur

le site de Roel Nusse (http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html) l'ensemble des gènes régulés par la ß-caténine). La ß-caténine interagit aussi physiquement et/ou fonctionnellement avec de nombreux récepteurs nucléaires. L'activation de la voie Wnt mène également à l'inhibition de l'expression de la E-cadhérine et à sa dissociation de la ß-caténine, dissociant alors l'ensemble du cytosquelette, l'adhésion intercellulaire et le contact à la matrice extra-cellulaire sont ainsi diminués. Ces conditions favorisent le processus invasif dans les cas où cette voie est dérégulée et conduit au développement tumoral.

Dans divers cancers, des mutations affectant les acteurs de cette voie sont décrites (Miller, 2002; Polakis, 2000) : les patients atteints de polypose adénomateuse familiale (PAF), qui prédispose aux cancers colorectaux, présentent des mutations germinales dans le gène APC. De plus, des mutations du gène APC sont retrouvées dans 80% des cas sporadiques d'adénomes ou de carcinomes colorectaux. Des mutations stabilisatrices de la ß-caténine, lui permettant d'échapper à la dégradation par le protéasome, sont décrites dans les carcinomes hépatiques. Toutes ces mutations conduisent à une activation aberrante de la signalisation Wnt dont l'effecteur principal, comme nous l'avons vu, est la ß-caténine.

Récemment, l'équipe de J. Bertherat a exploré l'implication de la voie Wnt/ß-caténine dans une série de 39 tumeurs cortico-surrénaliennes (26 adénomes et 13 carcinomes) (Tissier *et al.*, 2005). Les analyses immunohistochimiques ont montré une accumulation cytoplasmique et/ou nucléaire anormale de la ß-caténine dans 10 des 26 adénomes et 11 des 13 carcinomes, traduisant une activation de cette voie. Des mutations somatiques de la ß-caténine, dont la plupart affectent la sérine 45 qui est le site de phosphorylation de GSK3ß, ont été retrouvées dans certaines des tumeurs présentant une accumulation aberrante de la ß-caténine : 7 des 10 adénomes et 4 des 11 carcinomes. Ces mutations de la ß-caténine sont la première anomalie moléculaire retrouvée avec la même fréquence dans les tumeurs bénignes (7/26 : 27%) et les tumeurs malignes (4/13 : 31%), ce qui laisse supposer un schéma progressif du développement tumoral pour la cortico-surrénale d'un caractère bénin vers un caractère malin. De plus, dans les adénomes, les altérations de la ß-caténine semblent plus fréquentes dans les tumeurs non sécrétantes. Cette observation suggère que la dérégulation de la voie Wnt/ß-caténine serait impliquée dans le développement de tumeurs moins différenciées et donc plus agressives. Enfin, 11 des 13 carcinomes présentaient une dérégulation de l'accumulation de la ß-caténine alors que les mutations de la ß-caténine n'ont été retrouvées que dans 4 de ces tumeurs, ce qui suggère d'autres types d'anomalies, par exemple au niveau du gène *APC* ou au croisement de différentes voies de signalisation qui conduiraient à l'augmentation du pool de ß-caténine libre.

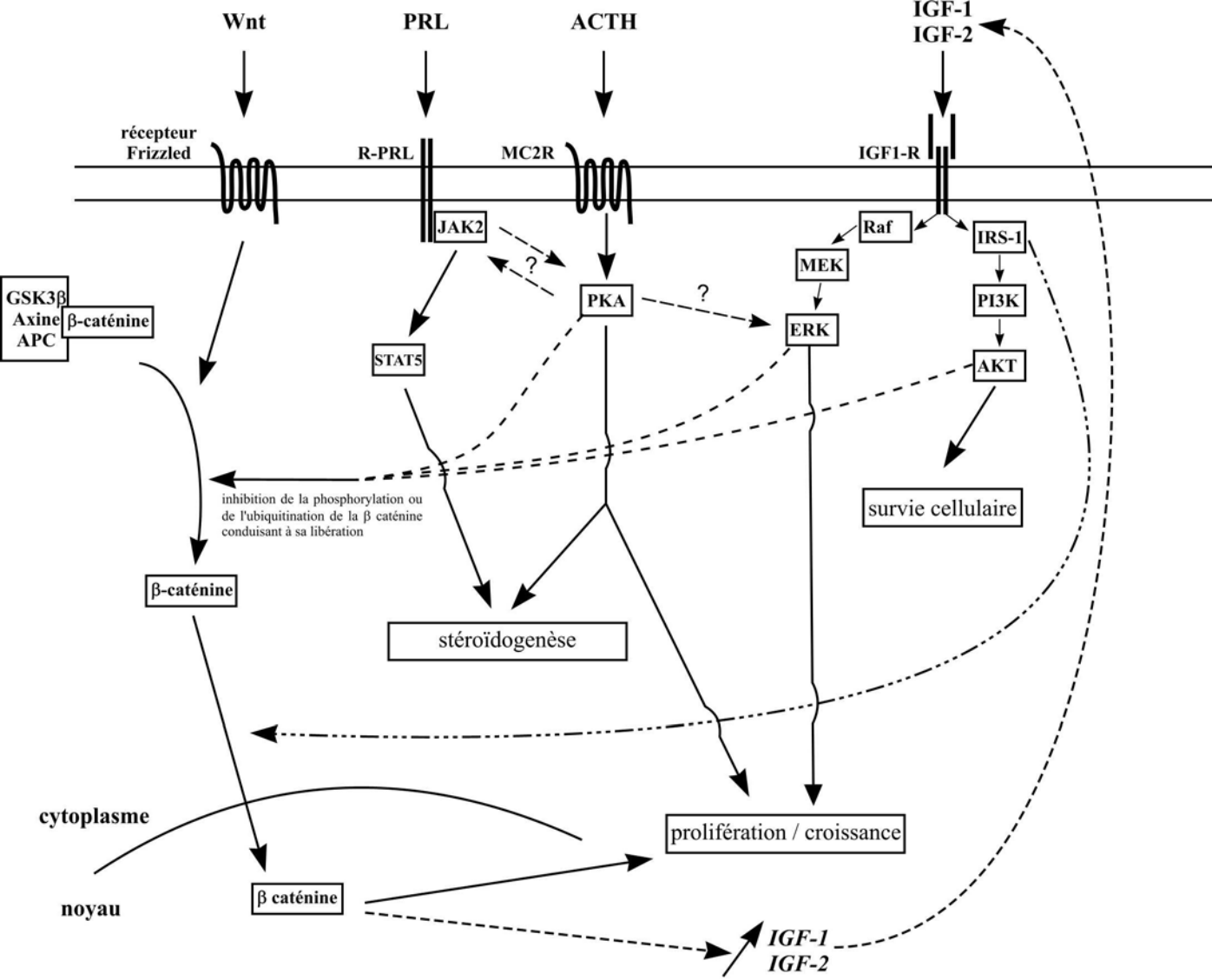


Figure D: Interconnection des différentes voies de signalisations impliquées dans le contrôle de la stéroïdogenèse, la prolifération et la survie cellulaire.

Nous avons mis en évidence au cours de cette thèse, qu'au niveau du cortex surrénalien, la PRL contrôle la stéroïdogenèse de façon similaire à l'ACTH. De plus, il existe une connection entre les voies de signalisation empruntées par ces deux hormones qui nous reste à explorer (?).

La dérégulation du système IGF, et plus particulièrement la sur-expression d'IGF2, est souvent retrouvée dans les cortico-surrénalomes, cependant les données que nous avons obtenu *in vitro* et *in vivo* nous laissent supposer que la seule sur-expression d'IGF2 n'est pas capable d'induire un processus tumoral.

Récemment, l'équipe de J. Berthérat a mis en évidence une dérégulation de la voie de la β-caténine dans les tumeurs du cortex surrénalien.

D'après les données bibliographiques (voir texte), de multiples interactions entre ces différentes voies de signalisation sont possibles et doivent être prises en compte pour appréhender les mécanismes du processus tumoral cortico-surrénalien. En effet, il est possible, que pour induire le développement tumoral, la dérégulation de plusieurs de ces voies soit nécessaire.

La signalisation empruntée par le récepteur IGF1-R conduit à l'activation de la voie PI3-Kinase/AKT et de la voie MAPK (ERK1/2) (Figure D). Une coopération entre la voie IGF et la voie Wnt/ß-caténine a été mise en évidence par exemple dans le cancer de la prostate (Verras and Sun, 2005) et dans des tumeurs du sein (Sawyer *et al.*, 2003). Une fois activées, les protéines ERK1/2 (Ding *et al.*, 2005) et AKT (Cross *et al.*, 1995) viendraient inhiber GSK3ß, l'empêchant de phosphoryler la ß-caténine ce qui conduirait à une augmentation de ß-caténine libre. Un rôle important a aussi été mis en évidence pour la protéine IRS-1 (insulin receptor substrate-1), protéine adaptatrice pour les récepteurs à l'insuline et aux IGFs, dans la régulation du transport nucléaire de la ß-caténine (Chen *et al.*, 2005). En effet, IRS-1 et la ß-caténine sont co-localisés et co-immunoprécipitent en présence d'IGF1 dans des extraits nucléaires et cytoplasmiques de fibroblastes embryonnaires de souris. D'une façon intéressante, il a été décrit dans des préadipocytes (3T3-L1) que la voie Wnt/ß-caténine pouvait contrôler l'expression d'*IGF1* et d'*IGF2* (Longo *et al.*, 2002). La sur-expression de Wnt-1 dans ces cellules conduit à l'augmentation de l'accumulation des ARNm *IGF1* et *IGF2*.

D'autres voies de signalisation peuvent aussi interférer avec celle de la ß-caténine. C'est le cas par exemple de la voie de la PKA. En effet, l'activation de la voie PKA entraînerait une phosphorylation de GSK3ß et de la ß-caténine (sérine 675) conduisant à une inhibition de GSK3ß empêchant ainsi l'ubiquitination de la ß-caténine (Hino *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2000).

La figure D représente les différentes voies impliquées dans le développement, le maintien de la fonction différenciée et celles potentiellement impliquées dans la progression tumorale. Toutes ces voies s'interconnectent et cela est à prendre en compte pour appréhender les mécanismes qui peuvent s'établirent lors du processus tumoral au sein du cortex surrénalien. En effet, il est possible que la dérégulation de plusieurs de ces voies soit nécessaire pour conduire au développement tumoral bénin et/ou malin. L'équipe du Dr Christine Perret a développé des souris transgéniques dont l'exon 14 du gène *apc* est « floxé » de séquences lox-P permettant son invalidation conditionnelle et spécifique de tissu (Colnot *et al.*, 2004). Nous envisageons, en collaboration avec cette équipe, d'invalider spécifiquement le gène *apc* dans le cortex surrénalien en apportant la Cre par un croisement avec nos souris *akr1b7/Cre* (Lambert-Langlais S., projet de thèse). Une autre approche consiste à exprimer spécifiquement dans le cortex surrénalien une ß-caténine mutante (Cadoret *et al.*, 2001; Saadi-Kheddouci *et al.*, 2001) qui n'est plus phosphorylée par la GSK3ß échappant ainsi à la dégradation et conduisant à une activation constitutive de la voie Wnt/ß-caténine. Nous

pourrons ainsi évaluer *in vivo* l'impact de l'activation de la voie Wnt/ß-caténine. Il sera aussi intéressant de croiser ces souris avec les souris sur-exprimant IGF2 dans le cortex surrénalien que nous avons créées dans le cadre de cette thèse. Ceci afin de tester une synergie possible de ces deux voies de signalisation dans le développement tumoral cortico-surrénalien à l'image de ce qui a été décrit pour la prostate et le sein (Sawyer *et al.*, 2003; Verras and Sun, 2005).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abd-Elaziz, M., Akahira, J., Moriya, T., Suzuki, T., Yaegashi, N., and Sasano, H., 2003, Nuclear receptor DAX-1 in human common epithelial ovarian carcinoma: an independent prognostic factor of clinical outcome, *Cancer Sci* **94**(11)**:**980-5.

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R., 1997, beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway, *Embo J* **16**(13)**:**3797-804.

Achermann, J. C., Ito, M., Hindmarsh, P. C., and Jameson, J. L., 1999, A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans, *Nat Genet* **22**(2)**:**125-6.

Achermann, J. C., Meeks, J. J., and Jameson, J. L., 2001, Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1, *Mol Cell Endocrinol* **185**(1-2)**:**17-25.

Achermann, J. C., Ozisik, G., Ito, M., Orun, U. A., Harmanci, K., Gurakan, B., and Jameson, J. L., 2002, Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner, *J Clin Endocrinol Metab* **87**(4)**:**1829-33.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., and Krieger, M., 1996, Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor, *Science* **271**(5248)**:**518-20.

Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F., and Krieger, M., 1994, Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor, *J Biol Chem* **269**(33)**:**21003-9.

Agarwal, S. K., Lee Burns, A., Sukhodolets, K. E., Kennedy, P. A., Obungu, V. H., Hickman, A. B., Mullendore, M. E., Whitten, I., Skarulis, M. C., Simonds, W. F., Mateo, C., Crabtree, J. S., Scacheri, P. C., Ji, Y., Novotny, E. A., Garrett-Beal, L., Ward, J. M., Libutti, S. K., Richard Alexander, H., Cerrato, A., Parisi, M. J., Santa Anna, A. S., Oliver, B., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Spiegel, A. M., and Marx, S. J., 2004, Molecular pathology of the MEN1 gene, *Ann N Y Acad Sci* **1014:**189-98.

Ahlgren, R., Suske, G., Waterman, M. R., and Lund, J., 1999, Role of Sp1 in cAMP-dependent transcriptional regulation of the bovine CYP11A gene, *J Biol Chem* **274**(27)**:**19422-8.

Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A. M., Veyssiere, G., and Jean, C. I., 1999, Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells, *J Endocrinol* **160**(1)**:**147-54.

Aigueperse, C., Val, P., Pacot, C., Darne, C., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Veyssiere, G., Jean, C., and Martinez, A., 2001, SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells, *Mol Endocrinol* **15**(1)**:**93-111.

Al-Hakim, A., Rui, X., Tsao, J., Albert, P. R., and Schimmer, B. P., 2004, Forskolin-resistant Y1 adrenal cell mutants are deficient in adenylyl cyclase type 4, *Mol Cell Endocrinol* **214**(1-2)**:**155-65.

Alarid, E. T., Windle, J. J., Whyte, D. B., and Mellon, P. L., 1996, Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice, *Development* **122**(10)**:**3319-29.

Altincicek, B., Tenbaum, S. P., Dressel, U., Thormeyer, D., Renkawitz, R., and Baniahmad, A., 2000, Interaction of the corepressor Alien with DAX-1 is abrogated by mutations of DAX-1 involved in adrenal hypoplasia congenita, *J Biol Chem* **275**(11)**:**7662-7.

Amieux, P. S., Howe, D. G., Knickerbocker, H., Lee, D. C., Su, T., Laszlo, G. S., Idzerda, R. L., and McKnight, G. S., 2002, Increased basal cAMP-dependent protein kinase

activity inhibits the formation of mesoderm-derived structures in the developing mouse embryo, *J Biol Chem* **277**(30)**:**27294-304.

Amieux, P. S., and McKnight, G. S., 2002, The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity, *Ann N Y Acad Sci* **968:**75-95.

Amri, H., Drieu, K., and Papadopoulos, V., 1997, Ex vivo regulation of adrenal cortical cell steroid and protein synthesis, in response to adrenocorticotropic hormone stimulation, by the Ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolide B, *Endocrinology* **138**(12)**:**5415-26.

Andersen, J. M., and Dietschy, J. M., 1981, Kinetic parameters of the lipoprotein transport systems in the adrenal gland of the rat determined in vivo. Comparison of low and high density lipoproteins of human and rat origin, *J Biol Chem* **256**(14)**:**7362-70.

Antoni, F. A., 1986, Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor, *Endocr Rev* **7**(4)**:**351-78.

Apaja, P. M., Aatsinki, J. T., Rajaniemi, H. J., and Petaja-Repo, U. E., 2005, Expression of the Mature Luteinizing Hormone Receptor in Rodent Urogenital and Adrenal Tissues Is Developmentally Regulated at a Post-Translational Level, *Endocrinology*.

Arakane, F., King, S. R., Du, Y., Kallen, C. B., Walsh, L. P., Watari, H., Stocco, D. M., and Strauss, J. F., 3rd, 1997, Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity, *J Biol Chem* **272**(51)**:**32656-62.

Atkinson, H. C., and Waddell, B. J., 1997, Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle, *Endocrinology* **138**(9)**:**3842-8.

Auersperg, N., 1978, Effects of culture conditions on the growth and differentiation of transformed rat adrenocortical cells, *Cancer Res* **38**(7)**:**1872-84.

Auersperg, N., Hudson, J. B., Goddard, E. G., and Klement, V., 1977, Transformation of cultured rat adrenocortical cells by Kirsten murine sarcoma virus (Ki-MSV), *Int J Cancer* **19**(1)**:**81-9.

Auersperg, N., Wan, M. W., Sanderson, R. A., Wong, K. S., and Mauldin, D., 1981, Morphological and functional differentiation of Kirsten murine sarcoma virus-transformed rat adrenocortical cell lines, *Cancer Res* **41**(5)**:**1763-71.

Babu, P. S., Bavers, D. L., Beuschlein, F., Shah, S., Jeffs, B., Jameson, J. L., and Hammer, G. D., 2002, Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1, *Endocrinology* **143**(2)**:**665-73.

Bamberger, A. M., Ezzat, S., Cao, B., Wong, M., Parker, K. L., Schulte, H. M., and Asa, S. L., 1996, Expression of steroidogenic factor-1 (SF-1) mRNA and protein in the human placenta, *Mol Hum Reprod* **2**(6)**:**457-61.

Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Floridia, G., Worley, K. C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E. R., Fraccaro, M., and et al., 1994, A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal, *Nat Genet* **7**(4)**:**497-501.

Barzon, L., Chilosi, M., Fallo, F., Martignoni, G., Montagna, L., Palu, G., and Boscaro, M., 2001, Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors, *Eur J Endocrinol* **145**(2)**:**207-12.

Beebe, S. J., Oyen, O., Sandberg, M., Froysa, A., Hansson, V., and Jahnsen, T., 1990, Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase, *Mol Endocrinol* **4**(3)**:**465-75.

Begeot, M., Shetty, U., Kilgore, M., Waterman, M., and Simpson, E., 1993, Regulation of expression of the CYP11A (P450scc) gene in bovine ovarian luteal cells by forskolin and phorbol esters, *J Biol Chem* **268**(23)**:**17317-25.

Ben-Zimra, M., Koler, M., and Orly, J., 2002, Transcription of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in the placenta: activating protein-2 assumes the role of steroidogenic factor- 1 by binding to an overlapping promoter element, *Mol Endocrinol* **16**(8)**:**1864-80.

Bernini, G. P., Moretti, A., Bonadio, A. G., Menicagli, M., Viacava, P., Naccarato, A. G., Iacconi, P., Miccoli, P., and Salvetti, A., 2002a, Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex, *J Clin Endocrinol Metab* **87**(11)**:**4961-5.

Bernini, G. P., Moretti, A., Viacava, P., Bonadio, A. G., Iacconi, P., Miccoli, P., and Salvetti, A., 2002b, Apoptosis control and proliferation marker in human normal and neoplastic adrenocortical tissues, *Br J Cancer* **86**(10)**:**1561-5.

Bertherat, J., Groussin, L., Sandrini, F., Matyakhina, L., Bei, T., Stergiopoulos, S., Papageorgiou, T., Bourdeau, I., Kirschner, L. S., Vincent-Dejean, C., Perlemoine, K., Gicquel, C., Bertagna, X., and Stratakis, C. A., 2003, Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity, *Cancer Res* **63**(17)**:**5308-19.

Beuschlein, F., Mutch, C., Bavers, D. L., Ulrich-Lai, Y. M., Engeland, W. C., Keegan, C., and Hammer, G. D., 2002, Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy, *Endocrinology* **143**(8)**:**3122-35.

Beuschlein, F., Reincke, M., Karl, M., Travis, W. D., Jaursch-Hancke, C., Abdelhamid, S., Chrousos, G. P., and Allolio, B., 1994, Clonal composition of human adrenocortical neoplasms, *Cancer Res* **54**(18)**:**4927-32.

Beyer, H. S., Matta, S. G., and Sharp, B. M., 1988, Regulation of the messenger ribonucleic acid for corticotropin- releasing factor in the paraventricular nucleus and other brain sites of the rat, *Endocrinology* **123**(4)**:**2117-23.

Biason-Lauber, A., and Schoenle, E. J., 2000, Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency, *Am J Hum Genet* **67**(6)**:**1563-8.

Bird, I. M., Hanley, N. A., Word, R. A., Mathis, J. M., McCarthy, J. L., Mason, J. I., and Rainey, W. E., 1993, Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion, *Endocrinology* **133**(4)**:**1555-61.

Bland, M. L., Jamieson, C., Akana, S., Dallman, M., and Ingraham, H. A., 2000, Gene dosage effects of steroidogenic factor 1 (SF-1) in adrenal development and the stress, *Endocr Res* **26**(4)**:**515-6.

Bliek, J., Maas, S. M., Ruijter, J. M., Hennekam, R. C., Alders, M., Westerveld, A., and Mannens, M. M., 2001, Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS, *Hum Mol Genet* **10**(5)**:**467-76.

Bloch, E., and Cohen, A. I., 1960, Steroid production in vitro by normal and adrenal tumor-bearing male mice, *J Natl Cancer Inst* **24:**97-107.

Blondet, A., Doghman, M., Durand, P., Begeot, M., and Naville, D., 2004, An E-box-containing region is involved in the tissue-specific expression of the human MC2R gene, *J Mol Endocrinol* **32**(3)**:**811-23.

Bockaert, J., and Pin, J. P., 1998, [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success], *C R Acad Sci III* **321**(7)**:**529-51.

Bold, R. J., Alpard, S., Ishizuka, J., Townsend, C. M., Jr., and Thompson, J. C., 1994, Growth-regulatory effect of gastrin on human colon cancer cell lines is determined by protein kinase a isoform content, *Regul Pept* **53**(1)**:**61-70.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P. A., 1998, Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice, *Endocr Rev* **19**(3)**:**225-68.

Bose, H., Lingappa, V. R., and Miller, W. L., 2002a, Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import, *Nature* **417**(6884)**:**87-91.

Bose, H. S., Lingappa, V. R., and Miller, W. L., 2002b, The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane, *Endocr Res* **28**(4)**:**295-308.

Boston, B. A., and Cone, R. D., 1996, Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line, *Endocrinology* **137**(5)**:**2043-50.

Boulle, N., Gicquel, C., Logie, A., Christol, R., Feige, J. J., and Le Bouc, Y., 2000, Fibroblast growth factor-2 inhibits the maturation of pro-insulin-like growth factor-II (Pro-IGF-II) and the expression of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in the human adrenocortical tumor cell line NCI-H295R, *Endocrinology* **141**(9)**:**3127-36.

Boulle, N., Logie, A., Gicquel, C., Perin, L., and Le Bouc, Y., 1998, Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors, *J Clin Endocrinol Metab* **83**(5)**:**1713-20.

Bouma, G. J., Albrecht, K. H., Washburn, L. L., Recknagel, A. K., Churchill, G. A., and Eicher, E. M., 2005, Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells, *Development* **132**(13)**:**3045-54.

Bourcigaux, N., Gaston, V., Logie, A., Bertagna, X., Le Bouc, Y., and Gicquel, C., 2000, High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors, *J Clin Endocrinol Metab* **85**(1)**:**322-30.

Bourdeau, I., Lacroix, A., Schurch, W., Caron, P., Antakly, T., and Stratakis, C. A., 2003, Primary pigmented nodular adrenocortical disease: paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur in vitro and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor, *J Clin Endocrinol Metab* **88**(8)**:**3931-7.

Brown, A. S., Hall, P. F., Shoyab, M., and Papadopoulos, V., 1992, Endozepine/diazepam binding inhibitor in adrenocortical and Leydig cell lines: absence of hormonal regulation, *Mol Cell Endocrinol* **83**(1)**:**1-9.

Brown, M. S., and Goldstein, J. L., 1986, A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science* **232**(4746)**:**34-47.

Bruhn, T. O., Sutton, R. E., Rivier, C. L., and Vale, W. W., 1984, Corticotropin-releasing factor regulates proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in vivo, *Neuroendocrinology* **39**(2)**:**170-5.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R., 2002, A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells, *Science* **296**(5567)**:**550-3.

Bu, S. Z., Yin, D. L., Ren, X. H., Jiang, L. Z., Wu, Z. J., Gao, Q. R., and Pei, G., 1997, Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines, *Cancer* **79**(10)**:**1944-50.

Buonassisi, V., Sato, G., and Cohen, A. I., 1962, Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin, *Proc Natl Acad Sci U S A* **48:**1184-90.

Cadoret, A., Ovejero, C., Saadi-Kheddouci, S., Souil, E., Fabre, M., Romagnolo, B., Kahn, A., and Perret, C., 2001, Hepatomegaly in transgenic mice expressing an oncogenic form of beta-catenin, *Cancer Res* **61**(8)**:**3245-9.

Calvo, D., and Vega, M. A., 1993, Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family, *J Biol Chem* **268**(25)**:**18929-35.

Cammas, F. M., Pullinger, G. D., Barker, S., and Clark, A. J., 1997, The mouse adrenocorticotropin receptor gene: cloning and characterization of its promoter and evidence for a role for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1, *Mol Endocrinol* **11**(7)**:**867-76.

Casey, M., Vaughan, C. J., He, J., Hatcher, C. J., Winter, J. M., Weremowicz, S., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Morton, C. C., and Basson, C. T., 2000, Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex, *J Clin Invest* **106**(5)**:**R31-8.

Casey, P. J., Graziano, M. P., Freissmuth, M., and Gilman, A. G., 1988, Role of G proteins in transmembrane signaling, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **53 Pt 1:**203-8.

Caspary, T., Cleary, M. A., Perlman, E. J., Zhang, P., Elledge, S. J., and Tilghman, S. M., 1999, Oppositely imprinted genes p57(Kip2) and igf2 interact in a mouse model for Beckwith-Wiedemann syndrome, *Genes Dev* **13**(23)**:**3115-24.

Cavallaro, S., Pani, L., Guidotti, A., and Costa, E., 1993, ACTH-induced mitochondrial DBI receptor (MDR) and diazepam binding inhibitor (DBI) expression in adrenals of hypophysectomized rats is not cause-effect related to its immediate steroidogenic action, *Life Sci* **53**(14)**:**1137-47.

Chanderbhan, R., Noland, B. J., Scallen, T. J., and Vahouny, G. V., 1982, Sterol carrier protein2. Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis, *J Biol Chem* **257**(15)**:**8928-34.

Chen, C., and Guo, I. C., 2000, Effect of cAMP on protein binding activities of three elements in upstream promoter of human CYP11A1 gene, *Life Sci* **67**(17)**:**2045-9.

Chen, J., Wu, A., Sun, H., Drakas, R., Garofalo, C., Cascio, S., Surmacz, E., and Baserga, R., 2005, Functional significance of type 1 insulin-like growth factor-mediated nuclear translocation of the insulin receptor substrate-1 and beta-catenin, *J Biol Chem* **280**(33)**:**29912-20.

Cheng, C. Y., Flasch, M. V., and Hornsby, P. J., 1992, Expression of 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in fetal human adrenocortical cells transfected with SV40 T antigen, *J Mol Endocrinol* **9**(1)**:**7-17.

Cheng, C. Y., and Hornsby, P. J., 1992, Expression of 11 beta-hydroxylase and 21-hydroxylase in long-term cultures of bovine adrenocortical cells requires extracellular matrix factors, *Endocrinology* **130**(5)**:**2883-9.

Cherradi, N., Bideau, M., Arnaudeau, S., Demaurex, N., James, R. W., Azhar, S., and Capponi, A. M., 2001, Angiotensin II promotes selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters in bovine adrenal glomerulosa and human adrenocortical carcinoma cells through induction of scavenger receptor class B type I, *Endocrinology* **142**(10)**:**4540-9.

Cho-Chung, Y. S., Clair, T., Tagliaferri, P., Ally, S., Katsaros, D., Tortora, G., Neckers, L., Avery, T. L., Crabtree, G. W., and Robins, R. K., 1989, Site-selective cyclic AMP analogs as new biological tools in growth control, differentiation, and proto-oncogene regulation, *Cancer Invest* **7**(2)**:**161-77.

Clark, A. J., 1998, Receptor hypersensitivity: a new phenomenon?, *Clin Endocrinol (Oxf)* **48**(2)**:**135-6.

Clark, A. J., Baig, A. H., Noon, L., Swords, F. M., Hunyady, L., and King, P. J., 2003, Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R), *Ann N Y Acad Sci* **994:**111-7.

Clark, B. J., Ranganathan, V., and Combs, R., 2001, Steroidogenic acute regulatory protein expression is dependent upon post-translational effects of cAMP-dependent protein kinase A, *Mol Cell Endocrinol* **173**(1-2)**:**183-92.

Clark, J. L., Metherell, L. A., Naville, D., Begeot, M., and Huebner, A., 2005, Genetics of ACTH insensitivity syndromes, *Ann Endocrinol (Paris)* **66**(3)**:**247-9.

Cleary, M. A., van Raamsdonk, C. D., Levorse, J., Zheng, B., Bradley, A., and Tilghman, S. M., 2001, Disruption of an imprinted gene cluster by a targeted chromosomal translocation in mice, *Nat Genet* **29**(1)**:**78-82.

Clegg, C. H., Cadd, G. G., and McKnight, G. S., 1988, Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(11)**:**3703-7.

Clipsham, R., and McCabe, E. R., 2003, DAX1 and its network partners: exploring complexity in development, *Mol Genet Metab* **80**(1-2)**:**81-120.

Cohen, A. I., Bloch, E., and Celozzi, E., 1957a, In vitro response of functional experimental adrenal tumors to corticotropin ACTH, *Proc Soc Exp Biol Med* **95**(2)**:**304-9.

Cohen, A. I., Furth, J., and Buffett, R. F., 1957b, Histologic and physiologic characteristics of hormone-secreting transplantable adrenal tumors in mice and rats, *Am J Pathol* **33**(4)**:**631-51.

Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M., and Perret, C., 2004, Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49)**:**17216-21.

Compagnone, N. A., Bair, S. R., and Mellon, S. H., 1997, Characterization of adrenocortical cell lines produced by genetically targeted tumorigenesis in transgenic mice, *Steroids* **62**(2)**:**238-43.

Corbin, J. D., Keely, S. L., and Park, C. R., 1975, The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues, *J Biol Chem* **250**(1)**:**218-25.

Cote, M., Payet, M. D., Dufour, M. N., Guillon, G., and Gallo-Payet, N., 1997, Association of the G protein alpha(q)/alpha11-subunit with cytoskeleton in adrenal glomerulosa cells: role in receptor-effector coupling, *Endocrinology* **138**(8)**:**3299-307.

Crabtree, J. S., Scacheri, P. C., Ward, J. M., Garrett-Beal, L., Emmert-Buck, M. R., Edgemon, K. A., Lorang, D., Libutti, S. K., Chandrasekharappa, S. C., Marx, S. J., Spiegel, A. M., and Collins, F. S., 2001, A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3)**:**1118-23.

Crawford, P. A., Dorn, C., Sadovsky, Y., and Milbrandt, J., 1998, Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1, *Mol Cell Biol* **18**(5)**:**2949-56.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B. A., 1995, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature* **378**(6559)**:**785-9.

Davis, L. G., Arentzen, R., Reid, J. M., Manning, R. W., Wolfson, B., Lawrence, K. L., and Baldino, F., Jr., 1986, Glucocorticoid sensitivity of vasopressin mRNA levels in the paraventricular nucleus of the rat, *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(4)**:**1145-9.

de Fraipont, F., El Atifi, M., Cherradi, N., Le Moigne, G., Defaye, G., Houlgatte, R., Bertherat, J., Bertagna, X., Plouin, P. F., Baudin, E., Berger, F., Gicquel, C., Chabre, O., and Feige, J. J., 2005, Gene expression profiling of human adrenocortical tumors

using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy, *J Clin Endocrinol Metab* **90**(3)**:**1819-29.

de Fraipont, F., El Atifi, M., Gicquel, C., Bertagna, X., Chambaz, E. M., and Feige, J. J., 2000, Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations, *J Clin Endocrinol Metab* **85**(12)**:**4734-41.

DeBaun, M. R., Niemitz, E. L., McNeil, D. E., Brandenburg, S. A., Lee, M. P., and Feinberg, A. P., 2002, Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects, *Am J Hum Genet* **70**(3)**:**604-11.

DeBold, C. R., Sheldon, W. R., DeCherney, G. S., Jackson, R. V., Alexander, A. N., Vale, W., Rivier, J., and Orth, D. N., 1984, Arginine vasopressin potentiates adrenocorticotropin release induced by ovine corticotropin-releasing factor, *J Clin Invest* **73**(2)**:**533-8.

Defer, N., Best-Belpomme, M., and Hanoune, J., 2000, Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase, *Am J Physiol Renal Physiol* **279**(3)**:**F400-16.

Desclozeaux, M., Krylova, I. N., Horn, F., Fletterick, R. J., and Ingraham, H. A., 2002, Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1, *Mol Cell Biol* **22**(20)**:**7193-203.

Diaz-Cano, S. J., de Miguel, M., Blanes, A., Galera, H., and Wolfe, H. J., 2001, Contribution of the microvessel network to the clonal and kinetic profiles of adrenal cortical proliferative lesions, *Hum Pathol* **32**(11)**:**1232-9.

DiGiammarino, E. L., Lee, A. S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R. C., Zambetti, G., and Kriwacki, R. W., 2001, A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer, *Nat Struct Biol* **9**(1)**:**12-16.

Ding, Q., Xia, W., Liu, J. C., Yang, J. Y., Lee, D. F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z., Bargou, R. C., Qin, J., Lai, C. C., Tsai, F. J., Tsai, C. H., and Hung, M. C., 2005, Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin, *Mol Cell* **19**(2)**:**159-70.

Domalik, L. J., Chaplin, D. D., Kirkman, M. S., Wu, R. C., Liu, W. W., Howard, T. A., Seldin, M. F., and Parker, K. L., 1991, Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids, *Mol Endocrinol* **5**(12)**:**1853-61.

Dorn, C., Ou, Q., Svaren, J., Crawford, P. A., and Sadovsky, Y., 1999, Activation of luteinizing hormone beta gene by gonadotropin-releasing hormone requires the synergy of early growth response-1 and steroidogenic factor-1, *J Biol Chem* **274**(20)**:**13870-6.

Dostert, A., and Heinzel, T., 2004, Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action, *Curr Pharm Des* **10**(23)**:**2807-16.

Dotzenrath, C., Teh, B. T., Farnebo, F., Cupisti, K., Svensson, A., Toell, A., Goretzki, P., and Larsson, C., 1996, Allelic loss of the retinoblastoma tumor suppressor gene: a marker for aggressive parathyroid tumors?, *J Clin Endocrinol Metab* **81**(9)**:**3194-6.

Drouin, J., Sun, Y. L., Chamberland, M., Gauthier, Y., De Lean, A., Nemer, M., and Schmidt, T. J., 1993, Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene, *Embo J* **12**(1)**:**145-56.

DuBois, R. N., Simpson, E. R., Kramer, R. E., and Waterman, M. R., 1981, Induction of synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P- 450 by adrenocorticotropin in cultured bovine adrenocortical cells, *J Biol Chem* **256**(13)**:**7000-5.

Eggenschwiler, J., Ludwig, T., Fisher, P., Leighton, P. A., Tilghman, S. M., and Efstratiadis, A., 1997, Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes, *Genes Dev* **11**(23)**:**3128-42.

Elias, L. L., Huebner, A., Metherell, L. A., Canas, A., Warne, G. L., Bitti, M. L., Cianfarani, S., Clayton, P. E., Savage, M. O., and Clark, A. J., 2000, Tall stature in familial glucocorticoid deficiency, *Clin Endocrinol (Oxf)* **53**(4)**:**423-30.

Engel, J. R., Smallwood, A., Harper, A., Higgins, M. J., Oshimura, M., Reik, W., Schofield, P. N., and Maher, E. R., 2000, Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome, *J Med Genet* **37**(12)**:**921-6.

Feliciello, A., Gottesman, M. E., and Avvedimento, E. V., 2005, cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases, *Cell Signal* **17**(3)**:**279-87.

Figueiredo, B. C., Cavalli, L. R., Pianovski, M. A., Lalli, E., Sandrini, R., Ribeiro, R. C., Zambetti, G., DeLacerda, L., Rodrigues, G. A., and Haddad, B. R., 2005, Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors, *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2)**:**615-9.

Fitzpatrick, G. V., Soloway, P. D., and Higgins, M. J., 2002, Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1, *Nat Genet* **32**(3)**:**426-31.

Fragoso, M. C., Domenice, S., Latronico, A. C., Martin, R. M., Pereira, M. A., Zerbini, M. C., Lucon, A. M., and Mendonca, B. B., 2003, Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene, *J Clin Endocrinol Metab* **88**(5)**:**2147-51.

Francis, S. H., and Corbin, J. D., 1999, Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action, *Crit Rev Clin Lab Sci* **36**(4)**:**275-328.

Frigeri, C., Tsao, J., Czerwinski, W., and Schimmer, B. P., 2000, Impaired steroidogenic factor 1 (NR5A1) activity in mutant Y1 mouse adrenocortical tumor cells, *Mol Endocrinol* **14**(4)**:**535-44.

Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A., and La Rocca, R. V., 1990, Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res* **50**(17)**:**5488-96.

Gether, U., 2000, Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors, *Endocr Rev* **21**(1)**:**90-113.

Gicquel, C., Baudin, E., Le Bouc, Y., and Schlumberger, M., 1997a, Adrenal carcinoma., *Ann Oncol* **8:**1-5.

Gicquel, C., Boulle, N., Logie, A., Bourcigaux, N., Gaston, V., and Le Bouc, Y., 2001, [Involvement of the IGF system in the pathogenesis of adrenocortical tumors], *Ann Endocrinol (Paris)* **62**(2)**:**189-92.

Gicquel, C., Leblond-Francillard, M., Bertagna, X., Louvel, A., Chapuis, Y., Luton, J. P., Girard, F., and Le Bouc, Y., 1994, Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas, *Clin Endocrinol (Oxf)* **40**(4)**:**465-77.

Gicquel, C., Raffin-Sanson, M. L., Gaston, V., Bertagna, X., Plouin, P. F., Schlumberger, M., Louvel, A., Luton, J. P., and Le Bouc, Y., 1997b, Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic

adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors, *J Clin Endocrinol Metab* **82**(8)**:**2559-65.

Giordano, T. J., Thomas, D. G., Kuick, R., Lizyness, M., Misek, D. E., Smith, A. L., Sanders, D., Aljundi, R. T., Gauger, P. G., Thompson, N. W., Taylor, J. M., and Hanash, S. M., 2003, Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis, *Am J Pathol* **162**(2)**:**521-31.

Goffin, V., Kinet, S., Ferrag, F., Binart, N., Martial, J. A., and Kelly, P. A., 1996, Antagonistic properties of human prolactin analogs that show paradoxical agonistic activity in the Nb2 bioassay, *J Biol Chem* **271**(28)**:**16573-9.

Gordon, K. E., Binas, B., Chapman, R. S., Kurian, K. M., Clarkson, R. W., Clark, A. J., Lane, E. B., and Watson, C. J., 2000, A novel cell culture model for studying differentiation and apoptosis in the mouse mammary gland, *Breast Cancer Res* **2**(3)**:**222-35.

Gospodarowicz, D., Ill, C. R., Hornsby, P. J., and Gill, G. N., 1977, Control of bovine adrenal cortical cell proliferation by fibroblast growth factor. Lack of effect of epidermal growth factor, *Endocrinology* **100**(4)**:**1080-9.

Goto, M., Brickwood, S., Wilson, D. I., Wood, P. J., Mason, J. I., and Hanley, N. A., 2002, Steroidogenic enzyme expression within the adrenal cortex during early human gestation, *Endocr Res* **28**(4)**:**641-5.

Gottesfeld, Z., and Liehr, J. G., 1987, Chronic exposure to random restraint stress retards the development of estrogen-induced pituitary prolactinoma in rats, *Neurosci Lett* **80**(1)**:**44-8.

Grandjean, V., Smith, J., Schofield, P. N., and Ferguson-Smith, A. C., 2000, Increased IGF-II protein affects p57kip2 expression in vivo and in vitro: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10)**:**5279-84.

Griffin, K. J., Kirschner, L. S., Matyakhina, L., Stergiopoulos, S., Robinson-White, A., Lenherr, S., Weinberg, F. D., Claflin, E., Meoli, E., Cho-Chung, Y. S., and Stratakis, C. A., 2004a, Down-regulation of regulatory subunit type 1A of protein kinase A leads to endocrine and other tumors, *Cancer Res* **64**(24)**:**8811-5.

Griffin, K. J., Kirschner, L. S., Matyakhina, L., Stergiopoulos, S. G., Robinson-White, A., Lenherr, S. M., Weinberg, F. D., Claflin, E. S., Batista, D., Bourdeau, I., Voutetakis, A., Sandrini, F., Meoli, E. M., Bauer, A. J., Cho-Chung, Y. S., Bornstein, S. R., Carney, J. A., and Stratakis, C. A., 2004b, A transgenic mouse bearing an antisense construct of regulatory subunit type 1A of protein kinase A develops endocrine and other tumours: comparison with Carney complex and other PRKAR1A induced lesions, *J Med Genet* **41**(12)**:**923-31.

Groussin, L., Jullian, E., Perlemoine, K., Louvel, A., Leheup, B., Luton, J. P., Bertagna, X., and Bertherat, J., 2002a, Mutations of the PRKAR1A gene in Cushing's syndrome due to sporadic primary pigmented nodular adrenocortical disease, *J Clin Endocrinol Metab* **87**(9)**:**4324-9.

Groussin, L., Kirschner, L. S., Vincent-Dejean, C., Perlemoine, K., Jullian, E., Delemer, B., Zacharieva, S., Pignatelli, D., Carney, J. A., Luton, J. P., Bertagna, X., Stratakis, C. A., and Bertherat, J., 2002b, Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD, *Am J Hum Genet* **71**(6)**:**1433-42.

Grunfeld, C., Hagman, J., Sabin, E. A., Buckley, D. I., Jones, D. S., and Ramachandran, J., 1985, Characterization of adrenocorticotropin receptors that appear when 3T3-L1 cells differentiate into adipocytes, *Endocrinology* **116**(1)**:**113-7.

Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., Redston, M., Gallinger, S., and Couture, J., 1997, Molecular biology of colorectal cancer, *Curr Probl Cancer* **21**(5)**:**233-300.

Guo, I. C., Tsai, H. M., and Chung, B. C., 1994, Actions of two different cAMP-responsive sequences and an enhancer of the human CYP11A1 (P450scc) gene in adrenal Y1 and placental JEG-3 cells, *J Biol Chem* **269**(9)**:**6362-9.

Guo, W., Burris, T. P., and McCabe, E. R., 1995, Expression of DAX-1, the gene responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism, in the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis, *Biochem Mol Med* **56**(1)**:**8-13.

Gurates, B., Amsterdam, A., Tamura, M., Yang, S., Zhou, J., Fang, Z., Amin, S., Sebastian, S., and Bulun, S. E., 2003, WT1 and DAX-1 regulate SF-1-mediated human P450arom gene expression in gonadal cells, *Mol Cell Endocrinol* **208**(1-2)**:**61-75.

Gurates, B., Sebastian, S., Yang, S., Zhou, J., Tamura, M., Fang, Z., Suzuki, T., Sasano, H., and Bulun, S. E., 2002, WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells, *J Clin Endocrinol Metab* **87**(9)**:**4369-77.

Gwynne, J. T., and Hess, B., 1980, The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis, *J Biol Chem* **255**(22)**:**10875-83.

Gwynne, J. T., Hess, B., Hughes, T., Rountree, R., and Mahaffee, D., 1984, The role of serum high density lipoproteins in adrenal steroidogenesis, *Endocr Res* **10**(3-4)**:**411-30.

Hanley, N. A., Rainey, W. E., Wilson, D. I., Ball, S. G., and Parker, K. L., 2001, Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation, *Mol Endocrinol* **15**(1)**:**57-68.

Hanoune, J., and Defer, N., 2001, Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41:**145-74.

Hanukoglu, I., Feuchtwanger, R., and Hanukoglu, A., 1990, Mechanism of corticotropin and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells, *J Biol Chem* **265**(33)**:**20602-8.

Hasegawa, T., Fukami, M., Sato, N., Katsumata, N., Sasaki, G., Fukutani, K., Morohashi, K., and Ogata, T., 2004, Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1, *J Clin Endocrinol Metab* **89**(12)**:**5930-5.

Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., and Morohashi, K., 1996, Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1, *Genes Cells* **1**(7)**:**663-71.

Hauet, T., Liu, J., Li, H., Gazouli, M., Culty, M., and Papadopoulos, V., 2002, PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells, *Endocr Res* **28**(4)**:**395-401.

Hayward, B. E., Kamiya, M., Strain, L., Moran, V., Campbell, R., Hayashizaki, Y., and Bonthron, D. T., 1998a, The human GNAS1 gene is imprinted and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17)**:**10038-43.

Hayward, B. E., Moran, V., Strain, L., and Bonthron, D. T., 1998b, Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26)**:**15475-80.

Higashijima, M., Nawata, H., Kato, K., and Ibayashi, H., 1987, Studies on lipoprotein and adrenal steroidogenesis: I. Roles of low density lipoprotein- and high density lipoprotein-cholesterol in steroid production in cultured human adrenocortical cells, *Endocrinol Jpn* **34**(5)**:**635-45.

Hilbers, U., Peters, J., Bornstein, S. R., Correa, F. M., Johren, O., Saavedra, J. M., and Ehrhart-Bornstein, M., 1999, Local renin-angiotensin system is involved in K+-

induced aldosterone secretion from human adrenocortical NCI-H295 cells, *Hypertension* **33**(4)**:**1025-30.

Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K. I., and Kikuchi, A., 2005, Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination, *Mol Cell Biol* **25**(20)**:**9063-72.

Hogan, B., Constantini, F., and Lacy, E., 1986, Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Holter, E., Kotaja, N., Makela, S., Strauss, L., Kietz, S., Janne, O. A., Gustafsson, J. A., Palvimo, J. J., and Treuter, E., 2002, Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1, *Mol Endocrinol* **16**(3)**:**515-28.

Holzer, R. G., MacDougall, C., Cortright, G., Atwood, K., Green, J. E., and Jorcyk, C. L., 2003, Development and characterization of a progressive series of mammary adenocarcinoma cell lines derived from the C3(1)/SV40 Large T-antigen transgenic mouse model, *Breast Cancer Res Treat* **77**(1)**:**65-76.

Honda, S., Morohashi, K., Nomura, M., Takeya, H., Kitajima, M., and Omura, T., 1993, Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily, *J Biol Chem* **268**(10)**:**7494-502.

Howe, A. K., 2004, Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA, *Biochim Biophys Acta* **1692**(2-3)**:**159-74.

Hu, M. C., Chou, S. J., Huang, Y. Y., Hsu, N. C., Li, H., and Chung, B. C., 1999, Tissue-specific, hormonal, and developmental regulation of SCC-LacZ expression in transgenic mice leads to adrenocortical zone characterization, *Endocrinology* **140**(12)**:**5609-18.

Hu, M. C., Hsu, N. C., Pai, C. I., Wang, C. K., and Chung, B., 2001, Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response, *Mol Endocrinol* **15**(5)**:**812-8.

Hurley, J. H., 1999, Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase, *J Biol Chem* **274**(12)**:**7599-602.

Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., and Penning, T. M., 2003, The aldo-keto reductase superfamily homepage, *Chem Biol Interact* **143-144:**621-31.

Ikeda, Y., Lala, D. S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M. P., and Parker, K. L., 1993, Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression, *Mol Endocrinol* **7**(7)**:**852-60.

Ikeda, Y., Shen, W. H., Ingraham, H. A., and Parker, K. L., 1994, Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases, *Mol Endocrinol* **8**(5)**:**654-62.

Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T. J., Hentges, K. E., Zanaria, E., Lalli, E., Tamai, K. T., Sassone-Corsi, P., Lovell-Badge, R., Camerino, G., and Parker, K. L., 1996, Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development, *Mol Endocrinol* **10**(10)**:**1261-72.

Ikeda, Y., Takeda, Y., Shikayama, T., Mukai, T., Hisano, S., and Morohashi, K. I., 2001, Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions, *Dev Dyn* **220**(4)**:**363-76.

Ilvesmaki, V., Kahri, A. I., Miettinen, P. J., and Voutilainen, R., 1993, Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas, *J Clin Endocrinol Metab* **77**(3)**:**852-8.

Ilvesmaki, V., Liu, J., Heikkila, P., Kahri, A. I., and Voutilainen, R., 1998, Expression of insulin-like growth factor binding protein 1-6 genes in adrenocortical tumors and pheochromocytomas, *Horm Metab Res* **30**(10)**:**619-23.

Imaizumi-Scherrer, T., Faust, D. M., Barradeau, S., Hellio, R., and Weiss, M. C., 2001, Type I protein kinase a is localized to interphase microtubules and strongly associated with the mitotic spindle, *Exp Cell Res* **264**(2)**:**250-65.

Ingraham, H. A., Lala, D. S., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W. H., Nachtigal, M. W., Abbud, R., Nilson, J. H., and Parker, K. L., 1994, The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis, *Genes Dev* **8**(19)**:**2302-12.

Ito, M., Yu, R., and Jameson, J. L., 1997, DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita, *Mol Cell Biol* **17**(3)**:**1476-83.

Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V. J., Beattie, W. G., Lohmann, S. M., Walter, U., Durica, J., Schulz, T. Z., Schiltz, E., Browner, M., and et al., 1986, Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells, *J Biol Chem* **261**(26)**:**12352-61.

Jefcoate, C. R., DiBartolomeis, M. J., Williams, C. A., and McNamara, B. C., 1987, ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells, *J Steroid Biochem* **27**(4-6)**:**721-9.

Jones, M. T., and Gillham, B., 1988, Factors involved in the regulation of adrenocorticotropic hormone/beta- lipotropic hormone, *Physiol Rev* **68**(3)**:**743-818.

Kananen, K., Markkula, M., el-Hefnawy, T., Zhang, F. P., Paukku, T., Su, J. G., Hsueh, A. J., and Huhtaniemi, I., 1996a, The mouse inhibin alpha-subunit promoter directs SV40 T-antigen to Leydig cells in transgenic mice, *Mol Cell Endocrinol* **119**(2)**:**135-46.

Kananen, K., Markkula, M., Mikola, M., Rainio, E. M., McNeilly, A., and Huhtaniemi, I., 1996b, Gonadectomy permits adrenocortical tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene: evidence for negative autoregulation of the inhibin alpha-subunit gene, *Mol Endocrinol* **10**(12)**:**1667-77.

Katoh-Fukui, Y., Owaki, A., Toyama, Y., Kusaka, M., Shinohara, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., and Morohashi, K. I., 2005, Mouse Polycombm M33 is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating Ad4BP/SF-1 expression, *Blood*.

Kawabe, K., Shikayama, T., Tsuboi, H., Oka, S., Oba, K., Yanase, T., Nawata, H., and Morohashi, K., 1999, Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1, *Mol Endocrinol* **13**(8)**:**1267-84.

Keegan, C. E., and Hammer, G. D., 2002, Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex, *Trends Endocrinol Metab* **13**(5)**:**200-8.

Kim, H. J., and Kim, T. Y., 2005, Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-II in human keratinocytes, differential involvement of mitogen-activated protein kinases and feedback inhibition of protein kinase C, *Br J Dermatol* **152**(3)**:**418-25.

Kim, K. W., Bae, S. K., Lee, O. H., Bae, M. H., Lee, M. J., and Park, B. C., 1998, Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma, *Cancer Res* **58**(2)**:**348-51.

King, B. R., Smith, R., and Nicholson, R. C., 2002, Novel glucocorticoid and cAMP interactions on the CRH gene promoter, *Mol Cell Endocrinol* **194**(1-2)**:**19-28.

Kirmizis, A., Bartley, S. M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P. J., 2004, Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27, *Genes Dev* **18**(13)**:**1592-605.

Kirschner, L. S., Carney, J. A., Pack, S. D., Taymans, S. E., Giatzakis, C., Cho, Y. S., Cho-Chung, Y. S., and Stratakis, C. A., 2000, Mutations of the gene encoding the protein

kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex, *Nat Genet* **26**(1)**:**89-92.

Kirschner, L. S., Kusewitt, D. F., Matyakhina, L., Towns, W. H., 2nd, Carney, J. A., Westphal, H., and Stratakis, C. A., 2005, A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues, *Cancer Res* **65**(11)**:**4506-14.

Kjellman, M., Kallioniemi, O. P., Karhu, R., Hoog, A., Farnebo, L. O., Auer, G., Larsson, C., and Backdahl, M., 1996, Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy, *Cancer Res* **56**(18)**:**4219-23.

Kloos, R. T., Gross, M. D., Francis, I. R., Korobkin, M., and Shapiro, B., 1995, Incidentally discovered adrenal masses, *Endocr Rev* **16**(4)**:**460-84.

Kloppenborg, P. W., Island, D. P., Liddle, G. W., Michelakis, A. M., and Nicholson, W. E., 1968, A method of preparing adrenal cell suspensions and its applicability to the in vitro study of adrenal metabolism, *Endocrinology* **82**(5)**:**1053-8.

Koskimies, P., Levallet, J., Sipila, P., Huhtaniemi, I., and Poutanen, M., 2002, Murine relaxin-like factor promoter: functional characterization and regulation by transcription factors steroidogenic factor 1 and DAX-1, *Endocrinology* **143**(3)**:**909-19.

Kotomura, N., Ninomiya, Y., Umesono, K., and Niwa, O., 1997, Transcriptional regulation by competition between ELP isoforms and nuclear receptors, *Biochem Biophys Res Commun* **230**(2)**:**407-12.

Koufos, A., Grundy, P., Morgan, K., Aleck, K. A., Hadro, T., Lampkin, B. C., Kalbakji, A., and Cavenee, W. K., 1989, Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms tumor locus both map to 11p15.5, *Am J Hum Genet* **44**(5)**:**711-9.

Kovanen, P. T., Goldstein, J. L., Chappell, D. A., and Brown, M. S., 1980, Regulation of low density lipoprotein receptors by adrenocorticotropin in the adrenal gland of mice and rats in vivo, *J Biol Chem* **255**(12)**:**5591-8.

Kozasa, T., Itoh, H., Tsukamoto, T., and Kaziro, Y., 1988, Isolation and characterization of the human Gs alpha gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(7)**:**2081-5.

Kramer, R. E., Anderson, C. M., Peterson, J. A., Simpson, E. R., and Waterman, M. R., 1982, Adrenodoxin biosynthesis by bovine adrenal cells in monolayer culture. Induction by adrenocorticotropin, *J Biol Chem* **257**(24)**:**14921-5.

Kramer, R. E., Rainey, W. E., Funkenstein, B., Dee, A., Simpson, E. R., and Waterman, M. R., 1984, Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP, *J Biol Chem* **259**(2)**:**707-13.

Kramer, R. E., Simpson, E. R., and Waterman, M. R., 1983, Steroidogenic refractoriness of bovine adrenocortical cells to dibutyryl cyclic AMP, *Steroids* **41**(2)**:**207-23.

Krieger, M., and Herz, J., 1994, Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP), *Annu Rev Biochem* **63:**601-37.

Krueger, K. E., and Papadopoulos, V., 1990, Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells, *J Biol Chem* **265**(25)**:**15015-22.

Krylova, I. N., Sablin, E. P., Moore, J., Xu, R. X., Waitt, G. M., MacKay, J. A., Juzumiene, D., Bynum, J. M., Madauss, K., Montana, V., Lebedeva, L., Suzawa, M., Williams, J. D., Williams, S. P., Guy, R. K., Thornton, J. W., Fletterick, R. J., Willson, T. M., and Ingraham, H. A., 2005, Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1, *Cell* **120**(3)**:**343-55.

Lala, D. S., Rice, D. A., and Parker, K. L., 1992, Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I, *Mol Endocrinol* **6**(8)**:**1249-58.

Lalli, E., Bardoni, B., Zazopoulos, E., Wurtz, J. M., Strom, T. M., Moras, D., and Sassone-Corsi, P., 1997, A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita, *Mol Endocrinol* **11**(13)**:**1950-60.

Lalli, E., Melner, M. H., Stocco, D. M., and Sassone-Corsi, P., 1998, DAX-1 blocks steroid production at multiple levels, *Endocrinology* **139**(10)**:**4237-43.

Lalli, E., Ohe, K., Hindelang, C., and Sassone-Corsi, P., 2000, Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA, *Mol Cell Biol* **20**(13)**:**4910-21.

Lalli, E., and Sassone-Corsi, P., 1994, Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP, *J Biol Chem* **269**(26)**:**17359-62.

Lam, W. W., Hatada, I., Ohishi, S., Mukai, T., Joyce, J. A., Cole, T. R., Donnai, D., Reik, W., Schofield, P. N., and Maher, E. R., 1999, Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation, *J Med Genet* **36**(7)**:**518-23.

Lamers, W. H., Hanson, R. W., and Meisner, H. M., 1982, cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei, *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(17)**:**5137-41.

Landis, C. A., Masters, S. B., Spada, A., Pace, A. M., Bourne, H. R., and Vallar, L., 1989, GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours, *Nature* **340**(6236)**:**692-6.

Langdon, S. P., Gabra, H., Bartlett, J. M., Rabiaz, G. J., Hawkins, R. A., Tesdale, A. L., Ritchie, A. A., Miller, W. R., and Smyth, J. F., 1998, Functionality of the progesterone receptor in ovarian cancer and its regulation by estrogen, *Clin Cancer Res* **4**(9)**:**2245-51.

Langlois, D., Saez, J. M., and Begeot, M., 1990, Effects of angiotensin-II on inositol phosphate accumulation and calcium influx in bovine adrenal and Y-1 tumor adrenal cells, *Endocr Res* **16**(1)**:**31-49.

Latronico, A. C., Pinto, E. M., Domenice, S., Fragoso, M. C., Martin, R. M., Zerbini, M. C., Lucon, A. M., and Mendonca, B. B., 2001, An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors, *J Clin Endocrinol Metab* **86**(10)**:**4970-3.

Latronico, A. C., Reincke, M., Mendonca, B. B., Arai, K., Mora, P., Allolio, B., Wajchenberg, B. L., Chrousos, G. P., and Tsigos, C., 1995, No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms, *J Clin Endocrinol Metab* **80**(3)**:**875-7.

Lau, E. T., Cao, D., Lin, C., Chung, S. K., and Chung, S. S., 1995, Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland, *Biochem J* **312**(Pt 2)**:**609-15.

Lavorgna, G., Ueda, H., Clos, J., and Wu, C., 1991, FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu, *Science* **252**(5007)**:**848-51.

Le Blanc, M., Russo, J., Kudelka, A. P., and Smith, J. A., 2002, An in vitro study of inhibitory activity of gossypol, a cottonseed extract, in human carcinoma cell lines, *Pharmacol Res* **46**(6)**:**551-5.

Leboulleux, S., Gaston, V., Boulle, N., Le Bouc, Y., and Gicquel, C., 2001, Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor locus:

a frequent but late event in adrenocortical tumorigenesis, *Eur J Endocrinol* **144**(2)**:**163-8.

Lebrethon, M. C., Naville, D., Begeot, M., and Saez, J. M., 1994, Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II, *J Clin Invest* **93**(4)**:**1828-33.

Lee, M. P., DeBaun, M. R., Mitsuya, K., Galonek, H. L., Brandenburg, S., Oshimura, M., and Feinberg, A. P., 1999, Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9)**:**5203-8.

Lefrancois-Martinez, A. M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Gallo-Payet, N., Hyndman, D., Veyssiere, G., Bertagna, X., Jean, C., and Martinez, A., 2004, Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors, *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6)**:**3010-9.

Lefrancois-Martinez, A. M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssiere, G., and Jean, C., 1999, Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells, *J Biol Chem* **274**(46)**:**32875-80.

Lehoux, J. G., and Lefebvre, A., 1991, Short-term effects of ACTH on the low-density lipoprotein receptor mRNA level in rat and hamster adrenals, *J Mol Endocrinol* **6**(3)**:**223-30.

Levine, A. J., 1997, p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* **88**(3)**:**323-31.

Levy, F. O., Oyen, O., Sandberg, M., Tasken, K., Eskild, W., Hansson, V., and Jahnsen, T., 1988, Molecular cloning, complementary deoxyribonucleic acid structure and predicted full-length amino acid sequence of the hormone-inducible regulatory subunit of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase from human testis, *Mol Endocrinol* **2**(12)**:**1364-73.

Li, F. P., and Fraumeni, J. F., Jr., 1969, Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome?, *Ann Intern Med* **71**(4)**:**747-52.

Li, L. A., Chiang, E. F., Chen, J. C., Hsu, N. C., Chen, Y. J., and Chung, B. C., 1999, Function of steroidogenic factor 1 domains in nuclear localization, transactivation, and interaction with transcription factor TFIIB and c- Jun, *Mol Endocrinol* **13**(9)**:**1588-98.

Li, M., Wang, X., Meintzer, M. K., Laessig, T., Birnbaum, M. J., and Heidenreich, K. A., 2000, Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta, *Mol Cell Biol* **20**(24)**:**9356-63.

Li, Y., Choi, M., Cavey, G., Daugherty, J., Suino, K., Kovach, A., Bingham, N. C., Kliewer, S. A., and Xu, H. E., 2005, Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, *Mol Cell* **17**(4)**:**491-502.

Light, K., Jenkins, P. J., Weber, A., Perrett, C., Grossman, A., Pistorello, M., Asa, S. L., Clayton, R. N., and Clark, A. J., 1995, Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia?, *Life Sci* **56**(18)**:**1523-7.

Liu, J., Heikkila, P., Kahri, A. I., and Voutilainen, R., 1996, Expression of the steroidogenic acute regulatory protein mRNA in adrenal tumors and cultured adrenal cells, *J Endocrinol* **150**(1)**:**43-50.

Liu, J., Heikkila, P., Meng, Q. H., Kahri, A. I., Tikkanen, M. J., and Voutilainen, R., 2000, Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals, *Eur J Endocrinol* **142**(6)**:**677-82.

Liu, J., Kahri, A. I., Heikkila, P., Ilvesmaki, V., and Voutilainen, R., 1995, H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells, *J Clin Endocrinol Metab* **80**(2)**:**492-6.

Liu, J., Kahri, A. I., Heikkila, P., and Voutilainen, R., 1997, Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells, *J Clin Endocrinol Metab* **82**(6)**:**1766-71.

Liu, J., Li, H., and Papadopoulos, V., 2003, PAP7, a PBR/PKA-RIalpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis, *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**(2-5)**:**275-83.

Liu, Z., and Simpson, E. R., 1997, Steroidogenic factor 1 (SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells, *Mol Endocrinol* **11**(2)**:**127-37.

Lo, M. J., Chang, L. L., and Wang, P. S., 2000, Effects of estradiol on corticosterone secretion in ovariectomized rats, *J Cell Biochem* **77**(4)**:**560-8.

Logie, A., Boudou, P., Boccon-Gibod, L., Baudin, E., Vassal, G., Schlumberger, M., Le Bouc, Y., and Gicquel, C., 2000, Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma xenograft model, *Endocrinology* **141**(9)**:**3165-71.

Logie, A., Boulle, N., Gaston, V., Perin, L., Boudou, P., Le Bouc, Y., and Gicquel, C., 1999, Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line, *J Mol Endocrinol* **23**(1)**:**23-32.

Longo, K. A., Kennell, J. A., Ochocinska, M. J., Ross, S. E., Wright, W. S., and MacDougald, O. A., 2002, Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors, *J Biol Chem* **277**(41)**:**38239-44.

Longui, C. A., Lemos-Marini, S. H., Figueiredo, B., Mendonca, B. B., Castro, M., Liberatore, R., Jr., Watanabe, C., Lancellotti, C. L., Rocha, M. N., Melo, M. B., Monte, O., Calliari, L. E., Guerra-Junior, G., Baptista, M. T., Sbragia-Neto, L., Latronico, A. C., Moreira, A., Tardelli, A. M., Nigri, A., Taymans, S. E., and Stratakis, C. A., 2004, Inhibin alpha-subunit (INHA) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from TP53 R337H mutation heterozygote carriers, *J Med Genet* **41**(5)**:**354-9.

Lopez, D., Nackley, A. C., Shea-Eaton, W., Xue, J., Schimmer, B. P., and McLean, M. P., 2001a, Effects of mutating different steroidogenic factor-1 protein regions on gene regulation, *Endocrine* **14**(3)**:**353-62.

Lopez, D., Shea-Eaton, W., Sanchez, M. D., and McLean, M. P., 2001b, DAX-1 represses the high-density lipoprotein receptor through interaction with positive regulators sterol regulatory element-binding protein-1a and steroidogenic factor-1, *Endocrinology* **142**(12)**:**5097-106.

Lu, T. T., Makishima, M., Repa, J. J., Schoonjans, K., Kerr, T. A., Auwerx, J., and Mangelsdorf, D. J., 2000, Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors, *Mol Cell* **6**(3)**:**507-15.

Luckow, B., and Schutz, G., 1987, CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements, *Nucleic Acids Res* **15**(13)**:**5490.

Lundblad, J. R., and Roberts, J. L., 1988, Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary, *Endocr Rev* **9**(1)**:**135-58.

Luo, X., Ikeda, Y., Lala, D., Rice, D., Wong, M., and Parker, K. L., 1999, Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for endocrine development and function, *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**(1-6)**:**13-8.

Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K. L., 1994, A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation, *Cell* **77**(4)**:**481-90.

Luo, X., Ikeda, Y., Schlosser, D. A., and Parker, K. L., 1995, Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse Ftz-F1 gene, *Mol Endocrinol* **9**(9)**:**1233-9.

Luton, J. P., Cerdas, S., Billaud, L., Guilhaume, B., Bertagna, X., Laudat, M. H., Louvel, A., Chapuis, Y., and Blondeau, P., 1990, Clinical features of adrenal carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy., *N Engl J Med* **322:**1195-1201.

Macfarlane, D. A., 1958, Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases, *Ann R Coll Surg Engl* **23**(3)**:**155-86.

Magennis, D. P., and McNicol, A. M., 1998, Vascular patterns in the normal and pathological human adrenal cortex, *Virchows Arch* **433**(1)**:**69-73.

Mallet, D., Bretones, P., Michel-Calemard, L., Dijoud, F., David, M., and Morel, Y., 2004, Gonadal Dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency, *J Clin Endocrinol Metab* **89**(10)**:**4829-4832.

Marchal, R., Naville, D., Durand, P., Begeot, M., and Penhoat, A., 1998, A steroidogenic factor-1 binding element is essential for basal human ACTH receptor gene transcription, *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1)**:**28-32.

Marsden, H. B., and Zakhour, H. D., 1978, Cytomegalic adrenal hypoplasia with pituitary cytomegaly, *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **378**(2)**:**105-10.

Martin, G., Pilon, A., Albert, C., Valle, M., Hum, D. W., Fruchart, J. C., Najib, J., Clavey, V., and Staels, B., 1999, Comparison of expression and regulation of the high-density lipoprotein receptor SR-BI and the low-density lipoprotein receptor in human adrenocortical carcinoma NCI-H295 cells, *Eur J Biochem* **261**(2)**:**481-91.

Martinez, A., Aigueperse, C., Darne, C., Lefrancois, A. M., Jean, C., and Veyssiere, G., 1998, The gene encoding the androgen-regulated aldose reductase like protein (MVDP) shows cAMP responsiveness in adrenocortical cells, *Endocr Res* **24**(3-4)**:**649-51.

Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A. M., Manin, M., Guyot, S., Jean-Faucher, C., Veyssiere, G., Kahn, A., and Jean, C., 1999, 5'-flanking and intragenic sequences confer androgenic and developmental regulation of mouse aldose reductase-like gene in vas deferens and adrenal in transgenic mice, *Endocrinology* **140**(3)**:**1338-48.

Martinez, A., Val, P., Jean, C., Veyssiere, G., and Lefrancois-Martinez, A. M., 2002, SF-1 controls the expression of the scavenger gene akr1b7: in vitro and in vivo approaches, *Endocr Res* **28**(4)**:**515-8.

Martinez, A., Val, P., Sahut-Barnola, I., Aigueperse, C., Veyssiere, G., and Lefrancois Martinez, A. M., 2003, SF-1 controls the aldose reductase akr1b7 gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site., *Endocrinology* **144**(5)**:**2111-2120.

Marx, S. J., 2005, Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2, *Nat Rev Cancer* **5**(5)**:**367-75.

Matozaki, T., Nakanishi, H., and Takai, Y., 2000, Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades, *Cell Signal* **12**(8)**:**515-24.

Matsuura, K., Deyashiki, Y., Bunai, Y., Ohya, I., and Hara, A., 1996, Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands, *Arch Biochem Biophys* **328**(2)**:**265-71.

Meeks, J. J., Weiss, J., and Jameson, J. L., 2003, Dax1 is required for testis determination, *Nat Genet* **34**(1)**:**32-3.

Mellon, S. H., Miller, W. L., Bair, S. R., Moore, C. C., Vigne, J. L., and Weiner, R. I., 1994, Steroidogenic adrenocortical cell lines produced by genetically targeted tumorigenesis in transgenic mice, *Mol Endocrinol* **8**(1)**:**97-108.

Mesiano, S., and Jaffe, R. B., 1997, Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex, *Endocr Rev* **18**(3)**:**378-403.

Metherell, L. A., Chapple, J. P., Cooray, S., David, A., Becker, C., Ruschendorf, F., Naville, D., Begeot, M., Khoo, B., Nurnberg, P., Huebner, A., Cheetham, M. E., and Clark, A. J., 2005, Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2, *Nat Genet* **37**(2)**:**166-70.

Metherell, L. A., Cooray, S., Huebner, A., Ruschendorf, F., Naville, D., Begeot, M., and Clark, A. J., 2004, Mutations in a novel gene, encoding a single transmembrane domain protein are associated with familial glucocorticoid deficiency type 2, *Endocr Res* **30**(4)**:**889-90.

Mikola, M., Kero, J., Nilson, J. H., Keri, R. A., Poutanen, M., and Huhtaniemi, I., 2003, High levels of luteinizing hormone analog stimulate gonadal and adrenal tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin-alpha-subunit promoter/Simian virus 40 T-antigen fusion gene, *Oncogene* **22**(21)**:**3269-78.

Miller, J. R., 2002, The Wnts, *Genome Biol* **3**(1)**:**REVIEWS3001.

Miller, W. L., 1995, Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis, *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**(5-6)**:**607-16.

Mitchell, J., Northup, J. K., and Schimmer, B. P., 1992, Defective guanyl nucleotide-binding protein beta gamma subunits in a forskolin-resistant mutant of the Y1 adrenocortical cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19)**:**8933-7.

Mohn, C. E., Fernandez-Solari, J., De Laurentiis, A., Prestifilippo, J. P., de la Cal, C., Funk, R., Bornstein, S. R., McCann, S. M., and Rettori, V., 2005, The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17)**:**6213-8.

Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H., and Omura, T., 1992, A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s, *J Biol Chem* **267**(25)**:**17913-9.

Morohashi, K., Iida, H., Nomura, M., Hatano, O., Honda, S., Tsukiyama, T., Niwa, O., Hara, T., Takakusu, A., Shibata, Y., and et al., 1994, Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues, *Mol Endocrinol* **8**(5)**:**643-53.

Morohashi, K., Tsuboi-Asai, H., Matsushita, S., Suda, M., Nakashima, M., Sasano, H., Hataba, Y., Li, C. L., Fukata, J., Irie, J., Watanabe, T., Nagura, H., and Li, E., 1999, Structural and functional abnormalities in the spleen of an mFtz-F1 gene-disrupted mouse, *Blood* **93**(5)**:**1586-94.

Mountjoy, K. G., Bird, I. M., Rainey, W. E., and Cone, R. D., 1994, ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines, *Mol Cell Endocrinol* **99**(1)**:**R17-20.

Mountjoy, K. G., Robbins, L. S., Mortrud, M. T., and Cone, R. D., 1992, The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors, *Science* **257**(5074)**:**1248-51.

Mukai, K., Mitani, F., Agake, R., and Ishimura, Y., 1998, Adrenocorticotropic hormone stimulates CYP11B1 gene transcription through a mechanism involving AP-1 factors, *Eur J Biochem* **256**(1)**:**190-200.

Mukai, K., Nagasawa, H., Agake-Suzuki, R., Mitani, F., Totani, K., Yanai, N., Obinata, M., Suematsu, M., and Ishimura, Y., 2002, Conditionally immortalized adrenocortical cell lines at undifferentiated states exhibit inducible expression of glucocorticoid-synthesizing genes, *Eur J Biochem* **269**(1)**:**69-81.

Murao, K., Terpstra, V., Green, S. R., Kondratenko, N., Steinberg, D., and Quehenberger, O., 1997, Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes, *J Biol Chem* **272**(28)**:**17551-7.

Muscatelli, F., Strom, T. M., Walker, A. P., Zanaria, E., Recan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl, W., and et al., 1994, Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism, *Nature* **372**(6507)**:**672-6.

Nachtigal, M. W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D. L., Flanagan, J. N., Hammer, G. D., and Ingraham, H. A., 1998, Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression, *Cell* **93**(3)**:**445-54.

Nakae, J., Tajima, T., Kusuda, S., Kohda, N., Okabe, T., Shinohara, N., Kato, M., Murashita, M., Mukai, T., Imanaka, K., and Fujieda, K., 1996, Truncation at the C-terminus of the DAX-1 protein impairs its biological actions in patients with X-linked adrenal hypoplasia congenita, *J Clin Endocrinol Metab* **81**(10)**:**3680-5.

Nalbant, D., Williams, S. C., Stocco, D. M., and Khan, S. A., 1998, Luteinizing hormone-dependent gene regulation in Leydig cells may be mediated by CCAAT/enhancer-binding protein-beta, *Endocrinology* **139**(1)**:**272-9.

Naville, D., Penhoat, A., Durand, P., and Begeot, M., 1999, Three steroidogenic factor-1 binding elements are required for constitutive and cAMP-regulated expression of the human adrenocorticotropin receptor gene, *Biochem Biophys Res Commun* **255**(1)**:**28-33.

Niemitz, E. L., DeBaun, M. R., Fallon, J., Murakami, K., Kugoh, H., Oshimura, M., and Feinberg, A. P., 2004, Microdeletion of LIT1 in familial Beckwith-Wiedemann syndrome, *Am J Hum Genet* **75**(5)**:**844-9.

Ninomiya, Y., Okada, M., Kotomura, N., Suzuki, K., Tsukiyama, T., and Niwa, O., 1995, Genomic organization and isoforms of the mouse ELP gene, *J Biochem (Tokyo)* **118**(2)**:**380-9.

O'Hare, M. J., and Neville, A. M., 1973, Morphological responses to corticotrophin and cyclic AMP by adult rat adrenocortical cells in monolayer culture, *J Endocrinol* **56**(3)**:**529-36.

Ohgaki, H., Kleihues, P., and Heitz, P. U., 1993, p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors, *Int J Cancer* **54**(3)**:**408-10.

Olson, M. F., Krolczyk, A. J., Gorman, K. B., Steinberg, R. A., and Schimmer, B. P., 1993, Molecular basis for the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate resistance of Kin mutant Y1 adrenocortical tumor cells, *Mol Endocrinol* **7**(4)**:**477-87.

Ormandy, C. J., Binart, N., and Kelly, P. A., 1997, Mammary gland development in prolactin receptor knockout mice, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2**(4)**:**355-64.

Orth, D. N., and Kovacs, N. J., 1998, The adrenal cortex, in: *Williams Text book of Endocrinology, 9th edition* (J. Wilson, D. Foster, H. Kronenberg, and P. Reed Larsen, eds.), WB Saunders company, Philadelphia, pp. 517-664.

Paavola, L. G., Strauss, J. F., 3rd, Boyd, C. O., and Nestler, J. E., 1985, Uptake of gold- and [3H]cholesteryl linoleate-labeled human low density lipoprotein by cultured rat granulosa cells: cellular mechanisms involved in lipoprotein metabolism and their importance to steroidogenesis, *J Cell Biol* **100**(4)**:**1235-47.

Pabon, J. E., Li, X., Lei, Z. M., Sanfilippo, J. S., Yussman, M. A., and Rao, C. V., 1996, Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands, *J Clin Endocrinol Metab* **81**(6)**:**2397-400.

Painter, T. A., and Jagelman, D. G., 1985, Adrenal adenomas and adrenal carcinomas in association with hereditary adenomatosis of the colon and rectum, *Cancer* **55**(9)**:**2001-4.

Parissenti, A. M., Parker, K. L., and Schimmer, B. P., 1993, Identification of promoter elements in the mouse 21-hydroxylase (Cyp21) gene that require a functional cyclic

adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase, *Mol Endocrinol* **7**(2)**:**283-90.

Park, E. A., Song, S., Vinson, C., and Roesler, W. J., 1999, Role of CCAAT enhancer-binding protein beta in the thyroid hormone and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription, *J Biol Chem* **274**(1)**:**211-7.

Parker, K. L., Chaplin, D. D., Wong, M., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Schimmer, B. P., 1985, Expression of murine 21-hydroxylase in mouse adrenal glands and in transfected Y1 adrenocortical tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23)**:**7860-4.

Parker, K. L., Ikeda, Y., and Luo, X., 1996, The roles of steroidogenic factor-1 in reproductive function, *Steroids* **61**(4)**:**161-5.

Parker, K. L., and Schimmer, B. P., 1997, Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function, *Endocr Rev* **18**(3)**:**361-77.

Patel, M. V., McKay, I. A., and Burrin, J. M., 2001, Transcriptional regulators of steroidogenesis, DAX-1 and SF-1, are expressed in human skin, *J Invest Dermatol* **117**(6)**:**1559-65.

Pezzi, V., Clark, B. J., Ando, S., Stocco, D. M., and Rainey, W. E., 1996, Role of calmodulin-dependent protein kinase II in the acute stimulation of aldosterone production, *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**(4)**:**417-24.

Pierson, R. W., Jr., 1967, Metabolism of steroid hormones in adrenal cortex tumor cultures, *Endocrinology* **81**(4)**:**693-707.

Ping, A. J., Reeve, A. E., Law, D. J., Young, M. R., Boehnke, M., and Feinberg, A. P., 1989, Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15, *Am J Hum Genet* **44**(5)**:**720-3.

Piontkewitz, Y., Enerback, S., and Hedin, L., 1993, Expression and hormonal regulation of the CCAAT enhancer binding protein-alpha during differentiation of rat ovarian follicles, *Endocrinology* **133**(5)**:**2327-33.

Polakis, P., 2000, Wnt signaling and cancer, *Genes Dev* **14**(15)**:**1837-51.

Qiu, R., Tsao, J., Kwan, W. K., and Schimmer, B. P., 1996, Mutations to forskolin resistance result in loss of adrenocorticotropin receptors and consequent reductions in levels of G protein alpha-subunits, *Mol Endocrinol* **10**(12)**:**1708-18.

Rae, P. A., Gutmann, N. S., Tsao, J., and Schimmer, B. P., 1979, Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(4)**:**1896-900.

Rainey, W. E., 1999, Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase, *Mol Cell Endocrinol* **151**(1-2)**:**151-60.

Rainey, W. E., Bird, I. M., and Mason, J. I., 1994, The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies, *Mol Cell Endocrinol* **100**(1-2)**:**45-50.

Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., McCarthy, J. L., McGee, E. A., Wester, R., and Mason, J. I., 1993, Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J Clin Endocrinol Metab* **77**(3)**:**731-7.

Ramayya, M. S., Zhou, J., Kino, T., Segars, J. H., Bondy, C. A., and Chrousos, G. P., 1997, Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies, *J Clin Endocrinol Metab* **82**(6)**:**1799-806.

Reik, W., and Walter, J., 2001, Genomic imprinting: parental influence on the genome, *Nat Rev Genet* **2**(1)**:**21-32.

Reincke, M., Beuschlein, F., Lalli, E., Arlt, W., Vay, S., Sassone-Corsi, P., and Allolio, B., 1998, DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis, *J Clin Endocrinol Metab* **83**(7)**:**2597-600.

Reincke, M., Karl, M., Travis, W. H., Mastorakos, G., Allolio, B., Linehan, H. M., and Chrousos, G. P., 1994, p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies, *J Clin Endocrinol Metab* **78**(3)**:**790-4.

Ribeiro, R. C., Sandrini, F., Figueiredo, B., Zambetti, G. P., Michalkiewicz, E., Lafferty, A. R., DeLacerda, L., Rabin, M., Cadwell, C., Sampaio, G., Cat, I., Stratakis, C. A., and Sandrini, R., 2001, An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16)**:**9330-5.

Rice, D. A., Mouw, A. R., Bogerd, A. M., and Parker, K. L., 1991, A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes, *Mol Endocrinol* **5**(10)**:**1552-61.

Rigotti, A., Edelman, E. R., Seifert, P., Iqbal, S. N., DeMattos, R. B., Temel, R. E., Krieger, M., and Williams, D. L., 1996, Regulation by adrenocorticotropic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland, *J Biol Chem* **271**(52)**:**33545-9.

Rilianawati, Paukku, T., Kero, J., Zhang, F. P., Rahman, N., Kananen, K., and Huhtaniemi, I., 1998, Direct luteinizing hormone action triggers adrenocortical tumorigenesis in castrated mice transgenic for the murine inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene, *Mol Endocrinol* **12**(6)**:**801-9.

Ringel, M. D., Schwindinger, W. F., and Levine, M. A., 1996, Clinical implications of genetic defects in G proteins. The molecular basis of McCune-Albright syndrome and Albright hereditary osteodystrophy, *Medicine (Baltimore)* **75**(4)**:**171-84.

Ringrose, L., Ehret, H., and Paro, R., 2004, Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes, *Mol Cell* **16**(4)**:**641-53.

Robinson-White, A., Hundley, T. R., Shiferaw, M., Bertherat, J., Sandrini, F., and Stratakis, C. A., 2003, Protein kinase-A activity in PRKAR1A-mutant cells, and regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, *Hum Mol Genet* **12**(13)**:**1475-84.

Rodriguez, G. C., Walmer, D. K., Cline, M., Krigman, H., Lessey, B. A., Whitaker, R. S., Dodge, R., and Hughes, C. L., 1998, Effect of progestin on the ovarian epithelium of macaques: cancer prevention through apoptosis?, *J Soc Gynecol Investig* **5**(5)**:**271-6.

Rodriguez, H., Hum, D. W., Staels, B., and Miller, W. L., 1997, Transcription of the human genes for cytochrome P450scc and P450c17 is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells, *J Clin Endocrinol Metab* **82**(2)**:**365-71.

Roesler, W. J., 2000, What is a cAMP response unit?, *Mol Cell Endocrinol* **162**(1-2)**:**1-7.

Roesler, W. J., 2001, The role of C/EBP in nutrient and hormonal regulation of gene expression, *Annu Rev Nutr* **21:**141-65.

Roesler, W. J., Vandenbark, G. R., and Hanson, R. W., 1988, Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription, *J Biol Chem* **263**(19)**:**9063-6.

Romero, D. G., Plonczynski, M., Vergara, G. R., Gomez-Sanchez, E. P., and Gomez-Sanchez, C. E., 2004, Angiotensin II early regulated genes in H295R human adrenocortical cells, *Physiol Genomics* **19**(1)**:**106-16.

Roskelley, C. D., and Auersperg, N., 1995, Rapid ras-oncogene-mediated transformation maintains steroidogenic differentiation in adrenocortical parenchymal cells, *Differentiation* **59**(2)**:**103-11.

Rossi, R., Tauchmanova, L., Luciano, A., Di Martino, M., Battista, C., Del Viscovo, L., Nuzzo, V., and Lombardi, G., 2000, Subclinical Cushing's syndrome in patients with

adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features, *J Clin Endocrinol Metab* **85**(4)**:**1440-8.

Rui, X., Al-Hakim, A., Tsao, J., Albert, P. R., and Schimmer, B. P., 2004, Expression of adenylyl cyclase-4 (AC-4) in Y1 and forskolin-resistant adrenal cells, *Mol Cell Endocrinol* **215**(1-2)**:**101-8.

Saadi-Kheddouci, S., Berrebi, D., Romagnolo, B., Cluzeaud, F., Peuchmaur, M., Kahn, A., Vandewalle, A., and Perret, C., 2001, Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene, *Oncogene* **20**(42)**:**5972-81.

Sadovsky, Y., Crawford, P. A., Woodson, K. G., Polish, J. A., Clements, M. A., Tourtellotte, L. M., Simburger, K., and Milbrandt, J., 1995, Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids, *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24)**:**10939-43.

Sahut-Barnola, I., Lefrancois-Martinez, A. M., Jean, C., Veyssiere, G., and Martinez, A., 2000, Adrenal tumorigenesis targeted by the corticotropin-regulated promoter of the aldo-keto reductase AKR1B7 gene in transgenic mice, *Endocr Res* **26**(4)**:**885-98.

Saito, S., Ito, K., Suzuki, T., Utsunomiya, H., Akahira, J., Sugihashi, Y., Niikura, H., Okamura, K., Yaegashi, N., and Sasano, H., 2005, Orphan nuclear receptor DAX-1 in human endometrium and its disorders, *Cancer Sci* **96**(10)**:**645-52.

Sandrini, F., Matyakhina, L., Sarlis, N. J., Kirschner, L. S., Farmakidis, C., Gimm, O., and Stratakis, C. A., 2002, Regulatory subunit type I-alpha of protein kinase A (PRKAR1A): a tumor-suppressor gene for sporadic thyroid cancer, *Genes Chromosomes Cancer* **35**(2)**:**182-92.

Sandrini, F., and Stratakis, C., 2003, Clinical and molecular genetics of Carney complex, *Mol Genet Metab* **78**(2)**:**83-92.

Sawyer, E. J., Hanby, A. M., Poulsom, R., Jeffery, R., Gillett, C. E., Ellis, I. O., Ellis, P., and Tomlinson, I. P., 2003, Beta-catenin abnormalities and associated insulin-like growth factor overexpression are important in phyllodes tumours and fibroadenomas of the breast, *J Pathol* **200**(5)**:**627-32.

Scacheri, P. C., Crabtree, J. S., Kennedy, A. L., Swain, G. P., Ward, J. M., Marx, S. J., Spiegel, A. M., and Collins, F. S., 2004, Homozygous loss of menin is well tolerated in liver, a tissue not affected in MEN1, *Mamm Genome* **15**(11)**:**872-7.

Schimmer, B. P., 1969, Phenotypically variant adrenal tumor cell cultures with biochemical lesions in the ACTH-stimulated steroidogenic pathway, *J Cell Physiol* **74**(2)**:**115-22.

Schimmer, B. P., 1979, Adrenocortical Y1 cells, *Methods Enzymol* **58:**570-4.

Schimmer, B. P., Cordova, M., Tsao, J., and Frigeri, C., 2003, A polymorphic form of steroidogenic factor 1 associated with ACTH receptor deficiency in mouse adrenal cell mutants, *Ann N Y Acad Sci* **994:**147-53.

Schimmer, B. P., and Tsao, J., 1984, Isolation of forskolin-resistant adrenal cells defective in the adenylate cyclase system, *J Biol Chem* **259**(9)**:**5376-9.

Schimmer, B. P., Tsao, J., and Knapp, M., 1977, Isolation of mutant adrenocortical tumor cells resistant to cyclic nucleotides, *Mol Cell Endocrinol* **8**(2)**:**135-45.

Schimmer, B. P., and Zimmerman, A. E., 1976, Steroidogenesis and extracellular cAMP accumulation in adrenal tumor cell cultures, *Mol Cell Endocrinol* **4**(4)**:**263-70.

Segaloff, D. L., and Ascoli, M., 1993, The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later, *Endocr Rev* **14**(3)**:**324-47.

Seol, W., Choi, H. S., and Moore, D. D., 1996, An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors, *Science* **272**(5266)**:**1336-9.

Shabb, J. B., 2001, Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase, *Chem Rev* **101**(8)**:**2381-411.

Shen, T., Suzuki, Y., Poyard, M., Best-Belpomme, M., Defer, N., and Hanoune, J., 1997, Localization and differential expression of adenylyl cyclase messenger ribonucleic acids in rat adrenal gland determined by in situ hybridization, *Endocrinology* **138**(11)**:**4591-8.

Shibata, H., Ikeda, Y., Mukai, T., Morohashi, K., Kurihara, I., Ando, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Murai, M., Saito, I., and Saruta, T., 2001, Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis, *Mol Genet Metab* **74**(1-2)**:**206-16.

Shinoda, K., Lei, H., Yoshii, H., Nomura, M., Nagano, M., Shiba, H., Sasaki, H., Osawa, Y., Ninomiya, Y., Niwa, O., and et al., 1995, Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice, *Dev Dyn* **204**(1)**:**22-9.

Simard, J., Berube, D., Sandberg, M., Grzeschik, K. H., Gagne, R., Hansson, V., and Jahnsen, T., 1992, Assignment of the gene encoding the catalytic subunit C beta of cAMP-dependent protein kinase to the p36 band on chromosome 1, *Hum Genet* **88**(6)**:**653-7.

Simonds, W. F., 1999, G protein regulation of adenylate cyclase, *Trends Pharmacol Sci* **20**(2)**:**66-73.

Simpson, E. R., and Waterman, M. R., 1988, Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH, *Annu Rev Physiol* **50:**427-40.

Slominski, A., Ermak, G., and Mihm, M., 1996, ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin, *J Clin Endocrinol Metab* **81**(7)**:**2746-9.

Smilinich, N. J., Day, C. D., Fitzpatrick, G. V., Caldwell, G. M., Lossie, A. C., Cooper, P. R., Smallwood, A. C., Joyce, J. A., Schofield, P. N., Reik, W., Nicholls, R. D., Weksberg, R., Driscoll, D. J., Maher, E. R., Shows, T. B., and Higgins, M. J., 1999, A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14)**:**8064-9.

Solberg, R., Sandberg, M., Natarajan, V., Torjesen, P. A., Hansson, V., Jahnsen, T., and Tasken, K., 1997, The human gene for the regulatory subunit RI alpha of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase: two distinct promoters provide differential regulation of alternately spliced messenger ribonucleic acids, *Endocrinology* **138**(1)**:**169-81.

Solberg, R., Tasken, K., Keiserud, A., and Jahnsen, T., 1991, Molecular cloning, cDNA structure and tissue-specific expression of the human regulatory subunit RI beta of cAMP-dependent protein kinases, *Biochem Biophys Res Commun* **176**(1)**:**166-72.

Sparago, A., Cerrato, F., Vernucci, M., Ferrero, G. B., Silengo, M. C., and Riccio, A., 2004, Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome, *Nat Genet* **36**(9)**:**958-60.

Staels, B., Hum, D. W., and Miller, W. L., 1993, Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal, *Mol Endocrinol* **7**(3)**:**423-33.

Stevens, V. L., Xu, T., and Lambeth, J. D., 1993, Cholesterol trafficking in steroidogenic cells. Reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a pre-steroidogenic pool, *Eur J Biochem* **216**(2)**:**557-63.

Stocco, D. M., 2001, StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis, *Annu Rev Physiol* **63:**193-213.

Stocco, D. M., and Clark, B. J., 1996, Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis, *Biochem Pharmacol* **51**(3)**:**197-205.

Stratakis, C. A., Sarlis, N., Kirschner, L. S., Carney, J. A., Doppman, J. L., Nieman, L. K., Chrousos, G. P., and Papanicolaou, D. A., 1999, Paradoxical response to dexamethasone in the diagnosis of primary pigmented nodular adrenocortical disease, *Ann Intern Med* **131**(8)**:**585-91.

Suarez, H. G., du Villard, J. A., Caillou, B., Schlumberger, M., Parmentier, C., and Monier, R., 1991, gsp mutations in human thyroid tumours, *Oncogene* **6**(4)**:**677-9.

Sugawara, T., Abe, S., Sakuragi, N., Fujimoto, Y., Nomura, E., Fujieda, K., Saito, M., and Fujimoto, S., 2001, RIP 140 modulates transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene through interactions with both SF-1 and DAX-1, *Endocrinology* **142**(8)**:**3570-7.

Sugawara, T., Saito, M., and Fujimoto, S., 2000, Sp1 and SF-1 interact and cooperate in the regulation of human steroidogenic acute regulatory protein gene expression, *Endocrinology* **141**(8)**:**2895-903.

Sun, F. L., Dean, W. L., Kelsey, G., Allen, N. D., and Reik, W., 1997, Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome, *Nature* **389**(6653)**:**809-15.

Suzuki, T., Moriya, T., Darnel, A. D., Takeyama, J., and Sasano, H., 2000, Immunohistochemical distribution of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human tissues, *Mol Cell Endocrinol* **164**(1-2)**:**69-75.

Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G., and Lovell-Badge, R., 1998, Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination, *Nature* **391**(6669)**:**761-7.

Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R., and Camerino, G., 1996, Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function, *Nat Genet* **12**(4)**:**404-9.

Swarnakar, S., Temel, R. E., Connelly, M. A., Azhar, S., and Williams, D. L., 1999, Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester, *J Biol Chem* **274**(42)**:**29733-9.

Swords, F. M., Baig, A., Malchoff, D. M., Malchoff, C. D., Thorner, M. O., King, P. J., Hunyady, L., and Clark, A. J., 2002, Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity, *Mol Endocrinol* **16**(12)**:**2746-53.

Swords, F. M., Noon, L. A., King, P. J., and Clark, A. J., 2004, Constitutive activation of the human ACTH receptor resulting from a synergistic interaction between two naturally occurring missense mutations in the MC2R gene, *Mol Cell Endocrinol* **213**(2)**:**149-54.

Szyf, M., Milstone, D. S., Schimmer, B. P., Parker, K. L., and Seidman, J. G., 1990, cis modification of the steroid 21-hydroxylase gene prevents its expression in the Y1 mouse adrenocortical tumor cell line, *Mol Endocrinol* **4**(8)**:**1144-52.

Takayama, K., Sasano, H., Fukaya, T., Morohashi, K., Suzuki, T., Tamura, M., Costa, M. J., and Yajima, A., 1995, Immunohistochemical localization of Ad4-binding protein with correlation to steroidogenic enzyme expression in cycling human ovaries and sex cord stromal tumors, *J Clin Endocrinol Metab* **80**(9)**:**2815-21.

Taragnat, C., Berger, M., and Jean, C., 1986, Identification and androgen-dependence of proteins in the mouse vas deferens, *Int J Androl* **9**(4)**:**299-311.

Tasken, K., and Aandahl, E. M., 2004, Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A, *Physiol Rev* **84**(1)**:**137-67.

Tasken, K., Naylor, S. L., Solberg, R., and Jahnsen, T., 1998, Mapping of the gene encoding the regulatory subunit RII alpha of cAMP-dependent protein kinase (locus PRKAR2A) to human chromosome region 3p21.3-p21.2, *Genomics* **50**(3)**:**378-81.

Tasken, K., Solberg, R., Zhao, Y., Hansson, V., Jahnsen, T., and Siciliano, M. J., 1996, The gene encoding the catalytic subunit C alpha of cAMP-dependent protein kinase (locus PRKACA) localizes to human chromosome region 19p13.1, *Genomics* **36**(3)**:**535-8.

Temel, R. E., Trigatti, B., DeMattos, R. B., Azhar, S., Krieger, M., and Williams, D. L., 1997, Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25)**:**13600-5.

Thomas, M., Suwa, T., Yang, L., Zhao, L., Hawks, C. L., and Hornsby, P. J., 2002, Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells, *Neoplasia* **4**(6)**:**493-500.

Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagnere, A. M., Rene-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X., Vacher-Lavenu, M. C., Perret, C., and Bertherat, J., 2005, Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors, *Cancer Res* **65**(17)**:**7622-7.

Tissier, F., Louvel, A., Grabar, S., Hagnere, A. M., Bertherat, J., Vacher-Lavenu, M. C., Dousset, B., Chapuis, Y., Bertagna, X., and Gicquel, C., 2004, Cyclin E correlates with malignancy and adverse prognosis in adrenocortical tumors, *Eur J Endocrinol* **150**(6)**:**809-17.

Tortora, G., and Ciardiello, F., 2002, Protein kinase A type I: a target for cancer therapy, *Clin Cancer Res* **8**(2)**:**303-4.

Toth, I. E., Szalay, K. S., Szabo, D., and Pill, J., 1990, Effect of a cholesterol synthesis inhibitor (BM 15.766) in the presence and absence of HDL on corticosteroidogenesis of isolated zona glomerulosa and fasciculata cells, *J Steroid Biochem Mol Biol* **37**(5)**:**687-91.

Tran, P. V., Lee, M. B., Marin, O., Xu, B., Jones, K. R., Reichardt, L. F., Rubenstein, J. R., and Ingraham, H. A., 2003, Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons, *Mol Cell Neurosci* **22**(4)**:**441-53.

Tremblay, J. J., and Viger, R. S., 2001, Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells, *Biol Reprod* **64**(4)**:**1191-9.

Tsilou, E. T., Chan, C. C., Sandrini, F., Rubin, B. I., Shen de, F., Carney, J. A., Kaiser-Kupfer, M., and Stratakis, C. A., 2004, Eyelid myxoma in Carney complex without PRKAR1A allelic loss, *Am J Med Genet A* **130**(4)**:**395-7.

Turner, H. E., Harris, A. L., Melmed, S., and Wass, J. A., 2003, Angiogenesis in endocrine tumors, *Endocr Rev* **24**(5)**:**600-32.

Val, P., Aigueperse, C., Ragazzon, B., Veyssiere, G., Lefrancois-Martinez, A. M., and Martinez, A., 2004, Adrenocorticotropin/3',5'-cyclic AMP-mediated transcription of the scavenger akr1-b7 gene in adrenocortical cells is dependent on three functionally distinct steroidogenic factor-1-responsive elements, *Endocrinology* **145**(2)**:**508-18.

Val, P., Lefrancois-Martinez, A. M., Veyssiere, G., and Martinez, A., 2003, SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues, *Nucl Recept* **1**(1)**:**8.

Vale, W., Vaughan, J., Smith, M., Yamamoto, G., Rivier, J., and Rivier, C., 1983, Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells, *Endocrinology* **113**(3)**:**1121-31.

Vanderbeld, B., and Kelly, G. M., 2000, New thoughts on the role of the beta-gamma subunit in G-protein signal transduction, *Biochem Cell Biol* **78**(5)**:**537-50.

Vandewalle, A., 2002, Immortalized renal proximal and collecting duct cell lines derived from transgenic mice harboring L-type pyruvate kinase promoters as tools for pharmacological and toxicological studies, *Cell Biol Toxicol* **18**(5)**:**321-8.

Verras, M., and Sun, Z., 2005, Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer, *Cancer Lett*.

Verschoor-Klootwyk, A. H., Verschoor, L., Azhar, S., and Reaven, G. M., 1982, Role of exogenous cholesterol in regulation of adrenal steroidogenesis in the rat, *J Biol Chem* **257**(13)**:**7666-71.

Veugelers, M., Wilkes, D., Burton, K., McDermott, D. A., Song, Y., Goldstein, M. M., La Perle, K., Vaughan, C. J., O'Hagan, A., Bennett, K. R., Meyer, B. J., Legius, E., Karttunen, M., Norio, R., Kaariainen, H., Lavyne, M., Neau, J. P., Richter, G., Kirali, K., Farnsworth, A., Stapleton, K., Morelli, P., Takanashi, Y., Bamforth, J. S., Eitelberger, F., Noszian, I., Manfroi, W., Powers, J., Mochizuki, Y., Imai, T., Ko, G. T., Driscoll, D. A., Goldmuntz, E., Edelberg, J. M., Collins, A., Eccles, D., Irvine, A. D., McKnight, G. S., and Basson, C. T., 2004, Comparative PRKAR1A genotype-phenotype analyses in humans with Carney complex and prkar1a haploinsufficient mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(39)**:**14222-7.

Voutilainen, R., and Miller, W. L., 1988, Developmental and hormonal regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and steroidogenic enzymes in human fetal adrenals and gonads, *DNA* **7**(1)**:**9-15.

Wachenfeld, C., Beuschlein, F., Zwermann, O., Mora, P., Fassnacht, M., Allolio, B., and Reincke, M., 2001, Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful?, *Eur J Endocrinol* **145**(3)**:**335-41.

Wang, Z. J., Jeffs, B., Ito, M., Achermann, J. C., Yu, R. N., Hales, D. B., and Jameson, J. L., 2001, Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14)**:**7988-93.

Watanabe, N., Inoue, H., and Fujii-Kuriyama, Y., 1994, Regulatory mechanisms of cAMP-dependent and cell-specific expression of human steroidogenic cytochrome P450scc (CYP11A1) gene, *Eur J Biochem* **222**(3)**:**825-34.

Watanabe, T., and Orth, D. N., 1987, Detailed kinetic analysis of adrenocorticotropin secretion by dispersed rat anterior pituitary cells in a microperifusion system: effects of ovine corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin, *Endocrinology* **121**(3)**:**1133-45.

Weber, M. M., Auernhammer, C. J., Kiess, W., and Engelhardt, D., 1997, Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands, *Eur J Endocrinol* **136**(3)**:**296-303.

Weber, M. M., Fottner, C., Schmidt, P., Brodowski, K. M., Gittner, K., Lahm, H., Engelhardt, D., and Wolf, E., 1999, Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis, *Endocrinology* **140**(4)**:**1537-43.

Weiss, L. M., 1984, Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors, *Am J Surg Pathol* **8**(3)**:**163-9.

West, L. A., Horvat, R. D., Roess, D. A., Barisas, B. G., Juengel, J. L., and Niswender, G. D., 2001, Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane, *Endocrinology* **142**(1)**:**502-5.

Whalin, M. E., Boujrad, N., Papadopoulos, V., and Krueger, K. E., 1994, Studies on the phosphorylation of the 18 kDa mitochondrial benzodiazepine receptor protein, *J Recept Res* **14**(3-4)**:**217-28.

Whitfeld, P. L., Seeburg, P. H., and Shine, J., 1982, The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence, and interspersion with repetitive DNA, *Dna* **1**(2)**:**133-43.

Williams, D. L., Temel, R. E., and Connelly, M. A., 2000, Roles of scavenger receptor BI and APO A-I in selective uptake of HDL cholesterol by adrenal cells, *Endocr Res* **26**(4)**:**639-51.

Wilson, H. L., and Roesler, W. J., 2002, CCAAT/enhancer binding proteins: do they possess intrinsic cAMP-inducible activity?, *Mol Cell Endocrinol* **188**(1-2)**:**15-20.

Wilson, T. E., Fahrner, T. J., and Milbrandt, J., 1993, The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction, *Mol Cell Biol* **13**(9)**:**5794-804.

Winston, J. T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C. Y., Elledge, S. J., and Harper, J. W., 1999, The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro, *Genes Dev* **13**(3)**:**270-83.

Wolf, E., Kramer, R., Blum, W. F., Foll, J., and Brem, G., 1994, Consequences of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth, *Endocrinology* **135**(5)**:**1877-86.

Wong, M., Rice, D. A., Parker, K. L., and Schimmer, B. P., 1989, The roles of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the expression of cholesterol side chain cleavage and steroid 11 beta-hydroxylase genes in mouse adrenocortical tumor cells, *J Biol Chem* **264**(22)**:**12867-71.

Wong, S. K., 2003, G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs, *Neurosignals* **12**(1)**:**1-12.

Yanai, N., Suzuki, M., and Obinata, M., 1991, Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene, *Exp Cell Res* **197**(1)**:**50-6.

Yasumura, Y., Buonassisi, V., and Sato, G., 1966, Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype, *Cancer Res* **26**(3)**:**529-35.

Young, M. R., Montpetit, M., Lozano, Y., Djordjevic, A., Devata, S., Matthews, J. P., Yedavalli, S., and Chejfec, G., 1995, Regulation of Lewis lung carcinoma invasion and metastasis by protein kinase A, *Int J Cancer* **61**(1)**:**104-9.

Yu, R. N., Ito, M., Saunders, T. L., Camper, S. A., and Jameson, J. L., 1998, Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis, *Nat Genet* **20**(4)**:**353-7.

Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T. M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A. P., McCabe, E. R., and et al., 1994, An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita, *Nature* **372**(6507)**:**635-41.

Zazopoulos, E., Lalli, E., Stocco, D. M., and Sassone-Corsi, P., 1997, DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis, *Nature* **390**(6657)**:**311-315.

Zenkert, S., Schubert, B., Fassnacht, M., Beuschlein, F., Allolio, B., and Reincke, M., 2000, Steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in adrenal tumours, *Eur J Endocrinol* **142**(3)**:**294-9.

Zhang, P., Liegeois, N. J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J. C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R. A., and Elledge, S. J., 1997, Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome, *Nature* **387**(6629)**:**151-8.

Zimmer, D. B., and Magnuson, M. A., 1990, Immunohistochemical localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in adult and developing mouse tissues, *J Histochem Cytochem* **38**(2)**:**171-8.

Zuber, M. X., Simpson, E. R., Hall, P. F., and Waterman, M. R., 1985, Effects of adrenocorticotropin on 17 alpha-hydroxylase activity and cytochrome P-450(17 alpha) synthesis in bovine adrenocortical cells, *J Biol Chem* **260**(3)**:**1842-8.

ANNEXE

0013-7227/04/$15.00/0
Printed in U.S.A.

Endocrinology 145(2):508–518
Copyright © 2004 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2003-1093

Adrenocorticotropin/3′,5′-Cyclic AMP-Mediated Transcription of the Scavenger *akr1-b7* Gene in Adrenocortical Cells Is Dependent on Three Functionally Distinct Steroidogenic Factor-1-Responsive Elements

PIERRE VAL, CHRISTELLE AIGUEPERSE, BRUNO RAGAZZON, GEORGES VEYSSIÈRE, ANNE-MARIE LEFRANÇOIS-MARTINEZ, AND ANTOINE MARTINEZ

Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique, Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière, France

The *akr1-b7* gene encodes a scavenger enzyme expressed in steroidogenic glands under pituitary control. In the zona fasciculata of the adrenal cortex where its expression is controlled by ACTH, AKR1-B7 detoxifies isocaproaldehyde produced during the first step of steroidogenesis. Three steroidogenic factor-1 (SF-1)-responsive elements (SFREs) are contained within the −510/+41 promoter region, which was previously demonstrated to drive gene expression in transgenic mice adrenal cortex. All these sequences bind at least SF-1 in Y1 adrenocortical cell nuclear extracts and can be activated by overexpression of this factor in HeLa cells. However, the three SFREs show distinct properties regarding *akr1-b7* promoter activity in Y1 cells. Whereas the proximal −102 SFRE supports basal promoter activity, the −458 *bona fide* SFRE is essential for both basal promoter activity and cAMP responsiveness, although it is unresponsive to cAMP when isolated from its promoter context. This suggests that SF-1 is not a cAMP-responsive factor *per se*. The neighboring SFRE at −503 is a palindromic sequence that binds monomeric and heteromeric SF-1 as well as an adrenal-specific complex. Using MA-10 Leydig cells and Y1–10r9 mutant cells, we provide evidence that its activity in adrenocortical cells depends on the binding of the adrenal-specific factor, which is required for basal and cAMP-induced promoter activity. Furthermore, the −503 site has intrinsic cAMP-sensing ability in Y1 cells, which is correlated with increased adrenal-specific complex binding. Collectively, our results suggest that cAMP responsiveness of the *akr1-b7* promoter is achieved through cooperation between the adrenal-specific factor bound to the −503 site and SF-1 bound to the −458 site. (*Endocrinology* 145: 508–518, 2004)

IN THE ZONA FASCICULATA of the adrenal cortex, steroidogenesis is controlled by the pituitary hormone ACTH through the cAMP pathway, which triggers coordinate transcription of all the steroidogenic enzymes (1–5) as well as cholesterol transporters (6–8) and detoxifying enzymes (9, 10), allowing increased production of corticosterone, the active glucocorticoid in rodents. This transcriptional activation implies complex arrays of transcription factors, some of which are ubiquitous like selective promoter factor 1 (Sp1) (11–14) and activator proteins 1 (15) and 2 (16), whereas others are tissue-enriched like GATA-4 (17, 18) and CCAAT/enhancer-binding protein-β (C/EBPβ) (11, 18) or nuclear receptors like Nur77 (19) and steroidogenic factor-1 (SF-1).

SF-1/Ftz-F1 encodes a tissue-specific orphan nuclear receptor (20, 21) whose expression is restricted to steroidogenic tissues (20), pituitary gonadotropes, ventromedial hypothalamus (22–24), spleen (25, 26), and skin (27). It activates gene transcription by binding to core nuclear receptor sequences (AAGGTCA) as a monomer. Its extensive role in the development and differentiation of steroidogenic tissues is illustrated by the complete lack of adrenals and gonads in homozygous knockout mice and by the effects of mutations in humans (for review, see Ref. 28). Moreover, SF-1 controls the tissue-restricted expression of all steroidogenic enzymes (28) and also participates to the cAMP-induced expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) (29), CYP11A1 (30), CYP11B1 (31), and CYP17 (32, 33), although the underlying mechanism is still controversial (34–37).

Some steroidogenic enzymes are specifically expressed in the gonads (CYP17 and CYP19), in the adrenals (CYP21), or even in certain adrenocortical zones (CYP11B1 in the fasciculata/reticularis; CYP11B2 in the glomerulosa). Because SF-1 is expressed in the gonads and throughout the entire adrenal cortex, it cannot account by itself for such a restricted expression pattern. This may rather rely on specific transcription factor combinations or on as yet unidentified cell-specific factors.

Cleavage of cholesterol by CYP11A1 during the first step of steroidogenesis delivers isocaproaldehyde, a toxic compound that is degraded by the product of the aldose-reductase *akr1-b7* gene (38). As expected from its function, *akr1-b7* is expressed in the gonads (39–41) and in the zona fasciculata of the adrenal cortex, where its expression is transcriptionally controlled by ACTH through activation of the cAMP pathway (9, 42). Previous experiments by our group have shown

Abbreviations: C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; ERE, estrogen-responsive element; RXR, retinoid X receptor; SF-1, steroidogenic factor-1; SFRE, SF-1-responsive element; Sp1, selective promoter factor.

***Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (http://www.endo-society.org), the foremost professional society serving the endocrine community.**

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

that a small proximal promoter fragment (–120/+41) was active in Y1 cells where it was responsive to cAMP. These experiments have shown the role of a cryptic SF-1-responsive element (SFRE) (–102) and of a nuclear factor-1 binding site (–76) in the basal activity of this promoter, whereas a C/EBP (–61) and a Sp1 binding site (–52) conveyed cAMP responsiveness (11). However, evidence from a number of experiments suggests that in the adrenal cortex, *akr1-b7* expression relies on a larger promoter fragment encompassing regions from −510 to +41. Indeed, this region is able to recapitulate all of the endogenous gene features in transgenic mice (43, 44) and shows the highest activity in transient transfections in Y1 cells (11). Last, the previously described proximal binding sites for C/EBP (–61), Sp1 (–52), nuclear factor 1 (–76), and SF-1 (–102) are dispensable for the expression of the ACTH-sensitive *rakr1-b7* rat orthologous gene in Y1 adrenocortical cells (41).

In the present paper, we describe the distinct functions of three SFREs implicated in the activity of the −510/+41 *akr1-b7* promoter in adrenocortical cells.

Materials and Methods

Cell transfections

Y1 cells were maintained in DMEM-Ham's F-12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μg streptomycin. HeLa cells were maintained in DMEM with Glutamax supplemented with 5% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 μg streptomycin. MA-10 cells were maintained in Waymouth medium supplemented with 15% horse serum, 1% insulin transferrin selenium, 2 mM L-glutamine, and antibiotics as above. Y1 10r9 cells (a kind gift of Dr. Schimmer, University of Toronto, Toronto, Canada) were maintained in Ham-F10 medium supplemented with 15% horse serum, 2.5% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics. Y1, HeLa, MA-10, and Y1 10r9 cells were transfected in six-well plates (Falcon 35–3502, Merck Eurolab, Strasbourg, France) 24 h after seeding at a density of 300×10^3 cells per well in complete medium. Y1 and Y1 10r9 cells were transfected with 1 μg reporter gene and 2 ng pRLSV40 (Promega, Charbonnières, France) using FuGene:6 (Roche, Meylan, France) following the manufacturer's instructions. The effect of 10^{-5} M forskolin (in dimethylsulfoxide) was assayed for 24 h, 12 h after transfection. HeLa cells were transfected for 29 h with Exgen500 reagent (Euromedex, Mundolsheim, France), according to the manufacturer's instructions. In the experiments described in Fig. 4, A and B, HeLa cells were transfected with 1 μg reporter gene, 2 ng pRLSV40 and 5 ng of pSG5-SF-1, encoding human SF-1 (11) or 5 ng of empty pSG5 (Stratagene Europe). MA-10 cells were transfected with 1 μg reporter gene using Exgen500 reagent. Effect of 10^{-5} M forskolin (in dimethylsulfoxide) was assayed for 24 h, 12 h after transfection. Luciferase and Renilla assays were performed in an automated luminometer with GenofaxA and GenofaxB reagents (Yelen, France), respectively. Each experiment was performed in triplicate and repeated at least three times. All data are expressed as means ± SD.

Gel shift assays

Gel shift experiments were performed as previously described (11). Where not stated, competitors were added as a 100-fold molar excess. Anti-SF-1 antibody was a kind gift of Dr. P. Berta (Montpellier, France). It was used at a concentration of 1 μl/20 μl reaction. Competitor oligonucleotides were COUP-TF, 5′-ACCCTTGACCCCTGCCCTG-CAGC-3′ (45); estrogen-responsive element (ERE), 5′-CGTCAGGTCA-CAGTGACCTGATG-3′ (46); Nur77/NGFI-B-responsive element (NBRE), 5′-TCGAGAGATAGAAAGGTCAGACGAC-3′ (47); 21-OH, 5′-CCACAGATTCTCCAAGGCTGATGG-3′ (48); and polyoma enhancer activator protein 3 (PEA3), 5′-GGCTAGTGAGCAGGAAG-TAGGGAGAG-3′ (49).

Northern blot

MA-10 and Y1 cells were cultured for 1, 3, 6, 12 (or 19), and 24 h in the presence of 10^{-5} M forskolin. Untreated cells were included as a control. RNAs were extracted using the Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Twenty micrograms of total RNAs were electrophoresed and blotted to a nylon Hybond N+ membrane (Amersham, Les Ulis, France). The *akr1-b7*, β-actin, or 18S rRNAs were then revealed using complementary ^{32}P-labeled probes.

DNA reporter constructs

The wild-type 0.5 kb *akr1-b7* promoter (–510/+41) was subcloned into the *Sma*I and *Bgl*II restriction sites of the pGL3 vector (pGL3 0.5). Mutagenesis was performed using the Gene Editor Kit (Promega), following the manufacturer's instructions. Oligonucleotides used were −503Bm, 5′-TTCTAGAAAGGTGTCCAT**TC**CCTACATTTA-3′; −503M8, 5′-TT-CTAGAAAGGTGTCCATGACC**GG**CATTTA-3′; −458m, 5′-AAAA-TCTTTCCACAA**TT**TCACCTGC-3′; and −102m, 5′-TTGACAT-GAAGTTCCT**TT**TCTCATG-3′. *Boldface* indicates mutated nucleotides. Deletions were constructed by inverse PCR using Herculase DNA polymerase (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), starting with 15 ng pGL3 0.5 as a template. Common primer was *Xma*I-pGL3R, 5′-CTAGCACGCGTAAGAGCTCGGTACCTAT-3′; construct-specific primers were Δ503F, 5′-ACATTTAAAAAAAAAAAAAATCTTTCCA-CAAGGTCA-3′ (leading to pGL3 503ΔAB), and Δ503AF, 5′-TGTCCAT-GACCTACATTTAAAAAAAAAAAAAATCTT-3′ (leading to pGL3 503ΔA). The PCR product was gel purified and phosphorylated. Twenty nanograms of the linear product were then self-ligated overnight and transformed into the DH5α bacterial strain. Two copies of each putative SFRE were tandemly inserted in the *Xho*I site of a pGL3Tk reporter plasmid (a kind gift of Dr. A. Bruhat, Institut National de la Recherche Agonomique, Clermont-Ferrand, France), where luciferase expression is driven by the minimal Tk promoter. Briefly, tandem double-stranded oligonucleotides with 5′ and 3′ *Xho*I overhangs were phosphorylated by T4PNK; sequences are as follows (all are times two): SFRE LHβD, 5′-TCGACTTCCCTGACCTTGTCTGTGACTTCCCTG-ACCTTGTCTGTGA-3′; SFRE LHβR, 5′-TCGATCACAGACAAGGT-CAGGGAAGTCACAGACAAGGTCAGGGAAG-3′; 503D, 5′-TCG-ATTCTAGAAAGGTGTCCATGACCTACATTTATTCTAGAAAGGT-GTCCATGACCTACATTTA-3′; 503R, 5′-TCGATAAATGTAGGTCAT-GGACACCTTTCTAGAATAAATGTAGGTCATGGACACCTTTC-TAGAA-3′; 458D, 5′-TCGAAAAATCTTTCCACAAGGTCACCT-GAAAATCT TTCCACAAGGTCACCTG-3′; 458R, 5′-TCGACAGGT-GACCTTGTGGAAAGATTTTCAGGTGACCTTGTGGAAAGATTTT-3′; 503Ad, 5′-TCGATTCTAGAAAGGTGTCCATGTTCTAGAAAGG-TGTCCATG-3′; 503Ar, 5′-TCGACATGGACACCTTTCTAGAACATG-GACACCTTTCTAGAA-3′; 503Bd, 5′-TCGATGTCCATGACCTA-CATTTATGTCCATGACCTACATTTA-3′; 503Br, 5′-TCGATAAATG-TAGGTCATGGACATAAATGTAGGTCATGGACA-3′. After purification (QiaQuick nucleotide removal kit, QIAGEN, Courtaboeuf, France), these were ligated in the open pGL3Tk vector. Inserted copy number was verified by DNA sequencing of the inserts.

Results

The search for elements that could account for adrenal activity of the −510/+41 promoter identified two new putative binding sites for SF-1 (Fig. 1A). The site at −503 is an imperfect palindrome of the AGGTCA core binding sequence for nuclear receptors, resembling an ERE. We will refer to the complete site as −503A+B, the 5′ half-site as −503A, and the 3′ half-site as −503B. The site at −458 is a perfectly canonical SFRE (AAGGTCA). The atypical site that resides in the proximal promoter (–102) was previously described (11). It plays an important role for *akr1-b7* promoter activity *in vivo* (44). Binding activities of the −458 and −503 sites were evaluated by EMSA experiments (Fig. 1B). When incubated with nuclear extracts from Y1 cells, the −458 site bound one specific complex that was displaced by the probe

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

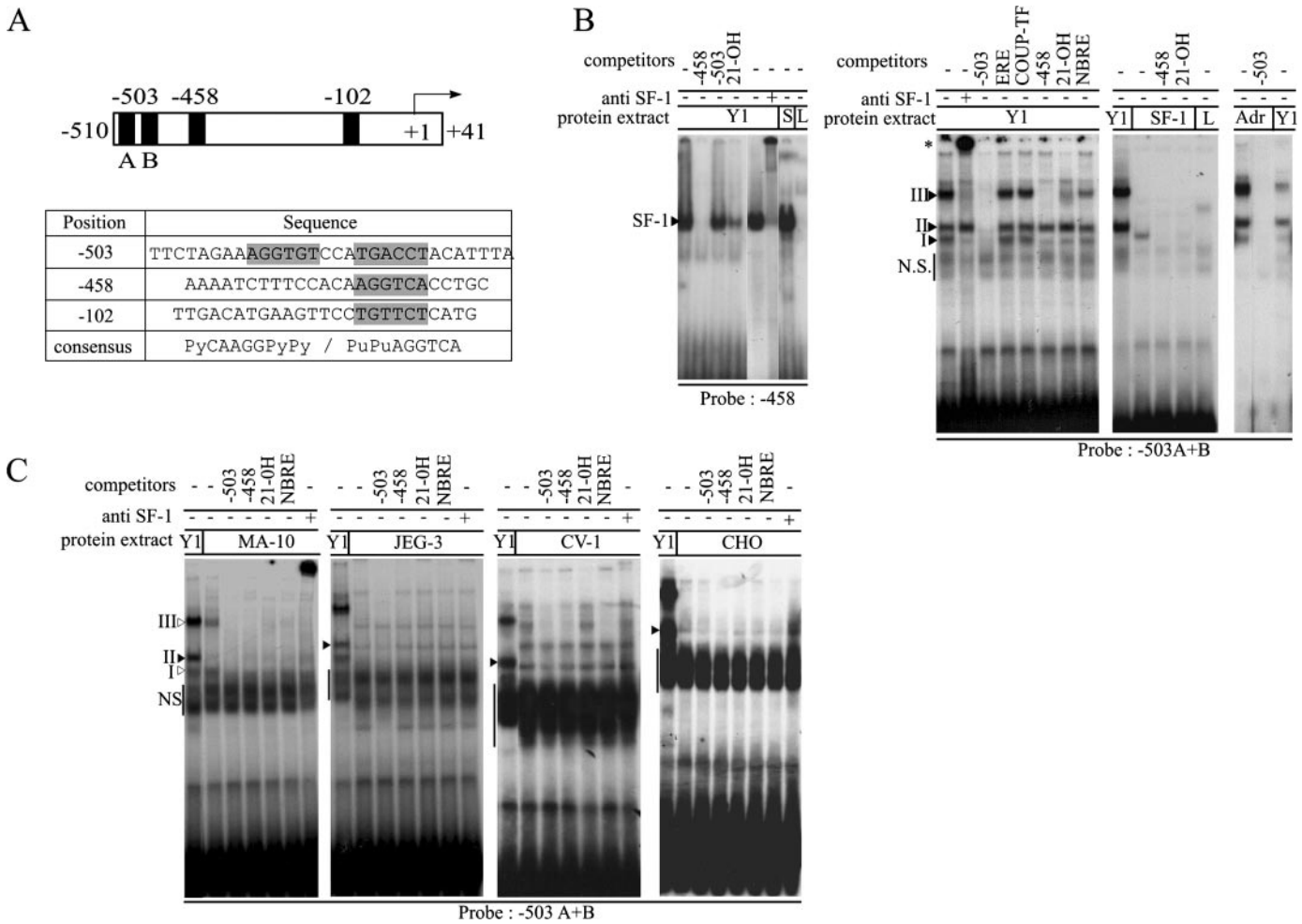


FIG. 1. SFREs of the −510/+41 *akr1-b7* promoter. A, Drawing of the two putative (–503 and −458) and the previously described SFREs. The −503 site is divided into two nuclear receptor core sequences in inverted orientation and separated by three nucleotides, a structure reminiscent of the ERE. The 5′ core sequence will be referred to as the −503A half-site, the 3′ core sequence as the −503B half-site. The sequences of the oligonucleotides used in gel-shift experiments, as well as of the consensus SFRE, are shown. Core sequences are *shaded*. B, Binding activities of the −458 or the −503 sites. The binding properties of the putative SFREs were evaluated by gel-shift experiments. The ^{32}P-labeled double-stranded oligonucleotide probes were incubated with 5 μg of adrenocortical Y1 cells (Y1) or mice adrenal nuclear extracts (Adr) as well as with 1 μl of *in vitro*-translated SF-1 protein (SF-1 or S) or control reticulocyte lysate (L). When indicated, cold oligonucleotide competitors were added to the binding reaction as a 50-fold molar excess. One microliter anti-SF-1 antibody was added to the reactions as indicated. *Asterisk* shows the supershifted complex. COUP-TF, binding site for COUP-TF; 21-OH, SF-1-responsive element of the CYP21 promoter; NBRE, Nur77/NGFI-B consensus responsive element. C, Complex II is adrenal specific. Gel-shift assays were performed as in B, except that nuclear extracts were either from Y1 cells, steroidogenic MA-10 Leydig cells, human choriocarcinoma steroidogenic JEG-3 cells, monkey kidney CV-1 cells, or Chinese hamster ovary CHO cells. *Arrowhead* shows complex II binding from control Y1 cells.

itself or by a consensus SFRE probe from the CYP21 promoter (48). Incubation of the DNA/protein complex with an antibody raised against SF-1 displaced and supershifted the complex. The identity of the retarded complex was further supported by incubation with *in vitro*-translated SF-1, which formed a complex comigrating with the one obtained with Y1 nuclear extracts. Collectively, these data indicate that the −458 site is a *bona fide* SFRE.

When incubated with nuclear extracts from Y1 cells, the −503A+B probe retained three specific complexes that were displaced by an excess of the cold probe itself. Competition with a consensus ERE did not displace any of the specific complexes, indicating that despite its high similarity with an ERE, the −503A+B site does not bind estrogen receptor in Y1 cells. Competition with the −458 SFRE or the CYP21 SFRE displaced the slowest (complex III) and the fastest (complex I) retarded complexes, indicating that these probably contained SF-1. This was confirmed by incubation with an antibody raised against SF-1. *In vitro*-translated SF-1 formed a complex comigrating with complex I, indicating that it was composed of monomeric SF-1. It must be noted, albeit not obvious from the data shown here, that complex I binding is hardly reproducible in repeated gel-shift experiments, probably reflecting low SF-1 affinity for the site. As complex III was not formed with *in vitro*-translated SF-1, we concluded that it may be composed of SF-1 associated with at least one other protein (SF-1/X complex). Retinoid X receptor (RXR) is a known partner of multiple nuclear receptors (50). Preincubation of EMSA reactions with an antibody raised against all RXR isoforms did not prevent the formation of the

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

complexes, showing that RXR is not associated with the proteins bound to the −503A+B site (data not shown). COUP-TF and Nur77 have been shown to respectively inhibit (51) or activate (52, 53) steroidogenic genes promoter by binding to AGGTCA sequences. Competition with consensus oligonucleotides for these two factors failed to displace any of the specific complexes, indicating that these factors were not part of the binding activities observed on the −503A+B site (data not shown). The presence of the three protein complexes in nontumor cells was confirmed by incubation of the −503A+B probe with nuclear extracts prepared from mice adrenals. From these experiments, we can conclude that the −503A+B site retains three specific complexes in adrenal nuclear extracts. Low-affinity complex I is monomeric SF-1, whereas complex III is composed of SF-1 and at least an unidentified protein partner (SF-1/X complex). In an attempt to refine our knowledge on complex II properties, we performed EMSA experiments with nuclear extracts from steroidogenic MA-10 and JEG-3 cells as well as nonsteroidogenic CV-1 and CHO cells (Fig. 1C). Interestingly, these experiments demonstrated that complex II was adrenal specific, whereas complex I and III were also observed with MA-10 Leydig cells that express SF-1 but not with JEG-3, CV-1, or CHO cells. In addition, because complex III is formed with both nuclear extracts from Y1 and MA-10 cells, we can rule out the adrenal-specific protein as a likely partner in the formation of complex III by interaction with SF-1.

We then sought to define the precise requirements for binding of the three specific complexes. These were determined by using the −503A or −503B probes in EMSA as well as by sequential mutagenesis of competitor −503A+B oligonucleotides (Fig. 2A). Interestingly, when incubated with Y1 nuclear extracts, the −503A site failed to bind any of the three complexes, whereas the −503B site strongly bound complex II (efficiently competed by an excess of the probe itself or the −503A+B site but not by the consensus CYP21 SFRE) and poorly retained complex I (Fig. 2B). Nonetheless, the −503B site alone was unable to bind complex III. This indicates that the −503A site is required to stabilize complex III interaction. Oligonucleotides mutated in the −503A site or −503A/–503B intervening region (M0 to M4) competed efficiently for the binding of the three complexes whereas a 50-fold molar excess of −503B mutants (M6 to M8) did not. However, when used in increasing doses, mutants M6, M7, and M8 showed slightly differing binding properties. Indeed, whereas a 100-fold molar excess of M6 oligonucleotide was still inefficient as a competitor, mutants M7 and M8 to a greater extent efficiently prevented complex I and III binding at a 100-fold excess, although they were still unable to compete for complex II formation.

Collectively, these data allow us to propose that complex I (monomeric SF-1) and complex II build on the −503B site alone, whereas complex III (SF-1/X) forms only with the complete −503A+B region, presumably by binding of the SF-1 partner on −503A (Fig. 2C). Whereas complex II formation requires the integrity of the whole −503B site (M6 to M8), complex I and III formation seems to be essentially affected by mutation in the 5′ part of the −503B site (M6). Based on these observations, binding properties of the mutants that will be used in transfection experiments are summarized in Fig. 2C, *lower panel*.

Effect of a two-nucleotide mutation on SF-1 binding to the −458 site was also analyzed by competition in EMSA. As shown in Fig. 2B, right panel, the mutant oligonucleotide failed to compete for SF-1 binding on the −458 wild-type probe, indicating that the mutation was indeed efficient.

To evaluate the relative SF-1 binding efficiencies of the different SFREs, we have compared the ability of increasing amounts of the −102, −458, and −503 oligonucleotides to compete for SF-1 binding on the −458 probe (Fig. 3). Quantitative analyses of the remaining binding activities after competition has demonstrated that the −458 site has the highest affinity for SF-1, followed by the −503 and −102 sites. Similar results were obtained with the CYP21 SFRE as a probe (data not shown).

Although our EMSA experiments have shown that the −503B, the −458, and the −102 sites were all able to bind SF-1 albeit with different affinities, only the −102 SFRE has been shown to mediate SF-1 transactivation in cell transfections (11). The ability of SF-1 to transactivate dimers of the isolated putative −503 and −458 SFREs driving the expression of the luciferase reporter gene through a minimal Tk promoter was evaluated by cotransfection experiments in the heterologous HeLa cell line (Fig. 4A). Cotransfection of the SF-1 expression plasmid led to a marked increase in the activities of the dimerized −503A+B (×4.9), −503B (×7.5), −458 (×4.1), and of the control LHβ SFRE (×3.0), when compared with the empty vector transfection. The −503A dimer, which showed no SF-1 binding in gel-shift assays, displayed only slight nonsignificant activation upon SF-1 overexpression (×1.9). Collectively, this shows that the isolated −503B and −458 sites are responsive to SF-1 in heterologous cells.

We then sought to analyze the effect of the SFRE mutations in the context of the −510/+41 promoter in response to SF-1 in HeLa cells (Fig. 4B). The wild-type −510/+41 promoter was markedly induced upon SF-1 transfection (×4.5), but this induction was markedly reduced by a single mutation of the −458 SFRE. Mutation of the −503B site alone (M6) or combined with mutation of the −102 site significantly, albeit slightly, affected promoter responsiveness to SF-1 overexpression. At last, deletion of the −503A site or mutation of the −102 site did not significantly alter promoter responsiveness to SF-1. Altogether, these data indicate a central role of the −458 SFRE for SF-1 responsiveness. These observations also indicate that the −503B site is not a highly SF-1-responsive sequence in the context of the −510/+41 promoter, suggesting that other protein complexes binding to this site (Figs. 1B and 2B) may have a role for its activity in the adrenals.

To assess the potential role of the proteins binding to −503A+B and −458 sites for *akr1-b7* expression in adrenals, constructs of the −510/+41 promoter bearing either individual or combined mutations and deletions of each of the SFREs were transfected in the Y1 adrenocortical cell line, and their ability to respond to cAMP increases was evaluated (Fig. 5A). The wild-type promoter construct drove a robust expression of the luciferase reporter gene that was further increased by forskolin treatment (5.6-fold induction). Deletion of the −503A site, which specifically prevents complex

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

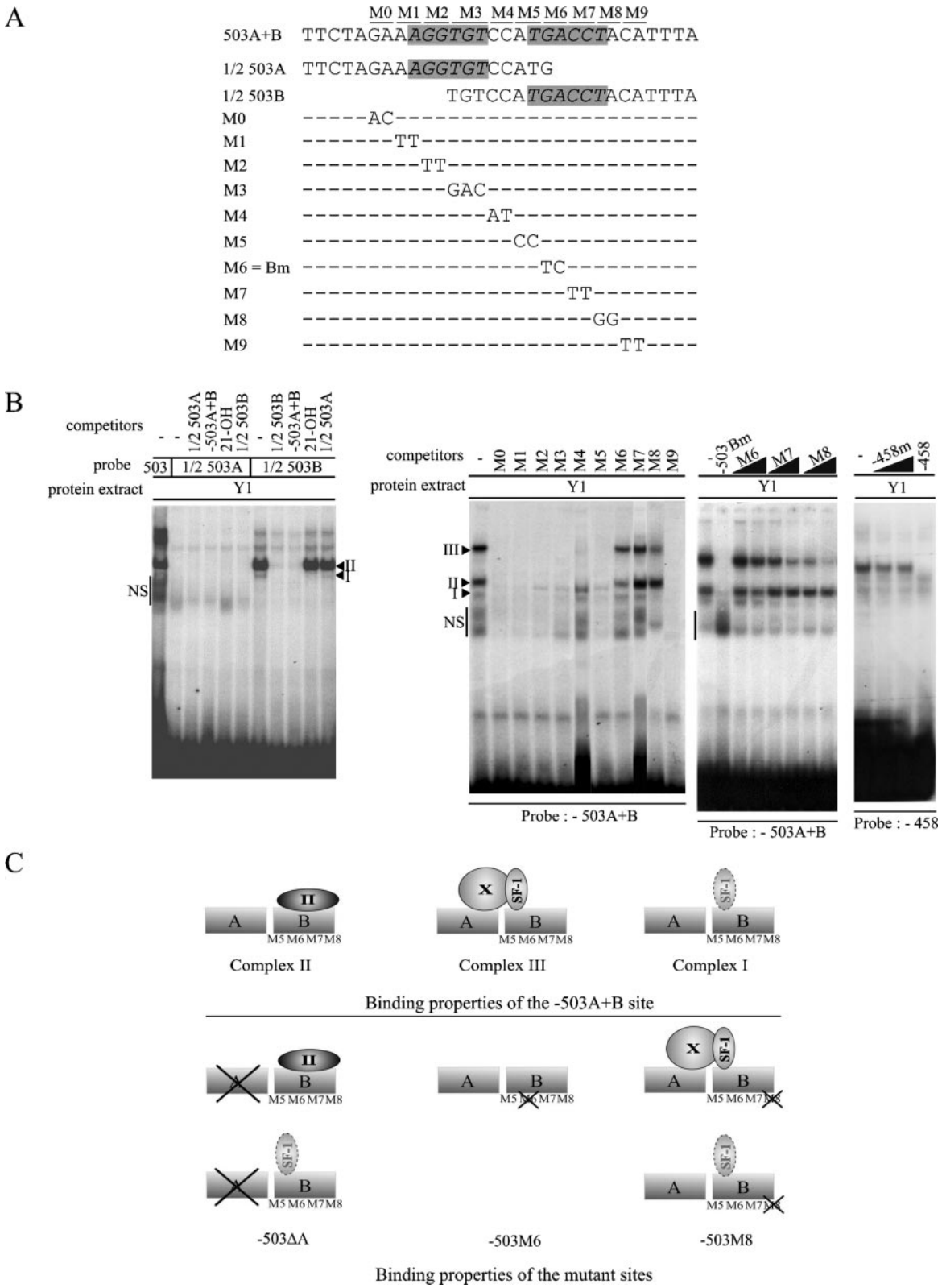


FIG. 2. Binding properties of the −503 site. A, Sequence alignment of the oligonucleotides used in gel-shift assays. Core nuclear receptor binding sequences are *shaded*. B, Binding properties of the mutant oligonucleotides. Gel-shift experiments were performed under the same conditions as described in Fig. 1B. Increasing doses of mutant oligonucleotides competitors were 50- and 100-fold molar excess. C, Summary of the binding activities. Complex II requires an intact −503B site to bind. Its binding is specifically abolished by mutation M8. Complex III forms only in the presence of an intact −503A site. Complex I and III binding is disrupted by a 5′ mutation (M6) in the −503B site but not by the most 3′ mutations (M8 and M9).

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

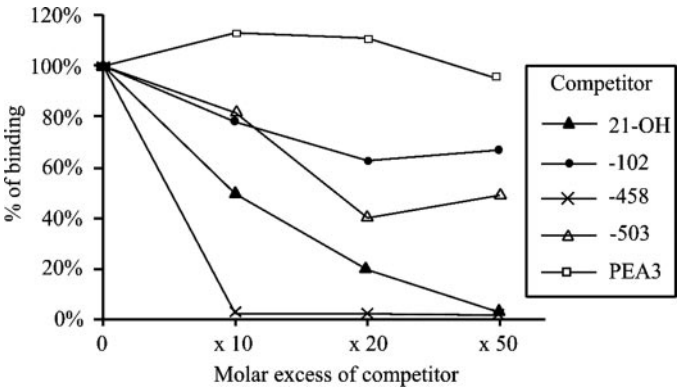


FIG. 3. Relative affinity of the SFREs for SF-1. Relative affinity for SF-1 was determined by competition in EMSA. Five microgams of Y1 nuclear extracts were incubated with 80 × 10^3 cpm of the labeled −458 probe in the presence of increasing amounts (10-, 20-, and 50-fold molar excess) of the different competitors. 21-OH SFRE and PEA3 oligonucleotides were included as positive and negative controls, respectively. Intensity of the SF-1 retarded complex was quantitated by phosphorimager analysis and normalized to the amount of free probe (in excess). Results are indicated as the mean percentage of binding activity (two independent experiments) relative to the experiments conducted in the absence of competitor DNA.

III binding (SF-1/X), resulted in a slight but significant increase in basal activity and forskolin sensitivity of the *akr1-b7* promoter, indicating that this complex might exhibit some repressive potential. However, complete deletion of the −503A+B site markedly decreased basal activity and forskolin sensitivity demonstrating that in Y1 cells, the whole site mainly retains activating rather than inhibiting complexes. Mutations of the −503B site that either prevented binding of complex II (M8) or of the three complexes (M6) also decreased basal promoter activity and forskolin sensitivity to a similar extent as −503A+B removal. As mutations that prevent the binding of complex II alone (M8) or the binding of the three complexes together (M6) have the same effect on promoter activity, it can be speculated that this is adrenal-specific complex II rather than SF-1 that acts as a stimulator of basal and forskolin-induced *akr1-b7* promoter activity. This will be demonstrated later in this paper.

Mutation of the −458 *bona fide* SFRE was the most potent in reducing overall activity as well as forskolin sensitivity of the promoter. Interestingly, combination of the −458 mutation with any other mutation did not show further decrease in promoter activity when compared with −458 mutation alone, suggesting that this SFRE plays a central role in *akr1-b7* promoter function in Y1 cells.

As already described (11, 44), mutation of the −102 site resulted only in a marked decrease in the basal activity of the promoter, whereas forskolin sensitivity was not affected.

Given that mutations of the −503B (or removal of the −503A+B site) and the −458 sites resulted in a decrease in cAMP responsiveness, the ability of these sites to sense cAMP increases when isolated from their promoter context was evaluated. The constructs of the dimerized SFREs were transfected into Y1 cells that were untreated or treated with 10^{-5} M forskolin (Fig. 5B). Despite the major effect of −458 mutation on forskolin responsiveness, the −458 site was completely unresponsive to forskolin when isolated from the promoter, suggesting that SF-1 bound to this site was not intrinsically responsive to cAMP. In fact, the −503B site was the minimally forskolin-responsive region in these conditions. As expected from the effect of their mutations, the −102 and −503A sites were not responsive to forskolin induction. Collectively, these experiments show that despite its central role in the basal and forskolin-induced promoter activity, the −458 site probably needs to cooperate with the nearby −503B site to achieve cAMP responsiveness in Y1 cells.

Our results suggest that −503A+B site activity relies on the −503B region, which binds complex II with high affinity and SF-1 (complex I) with low affinity. We thus undertook a number of experiments to understand which of these two complexes was responsible for transcription activation on the −503B site.

The *akr1-b7* gene was previously shown to be expressed in mouse testes and MA-10 Leydig cells (40, 41, 54). We thus asked whether *akr1-b7* cAMP sensitivity would be conserved in MA-10 cells that do not express complex II but express SF-1. Interestingly, *akr1-b7* mRNA accumulation was less sensitive to forskolin treatment in MA-10 when compared with Y1 cells (Fig. 6A). This was not due to low SF-1 binding activity as demonstrated by EMSA (data not shown). We then transfected the wild-type 0.5-kb promoter or −503B mutants (M6 and M8) in MA-10 cells and assessed their ability to sense cAMP increases (Fig. 6B). None of the two mutations significantly altered basal promoter activity or forskolin sensitivity, indicating that in MA-10 cells, the −503B site was simply not functional. Conversely, this demonstrates that −503B site activity in Y1 cells most probably relies on adrenal-specific complex II rather than on SF-1. This was further confirmed by analyzing the activities of the dimerized −503B and −503A+B sites in Y1 10r9 cells known to harbor an impaired SF-1 activity (55) (Fig. 6C). Indeed, the −503B half-site was even more sensitive to cAMP increases in Y1 10r9 cells than in wild-type Y1 cells, whereas the −503A+B site had an equivalent sensitivity. As a control, the −458 site did not show cAMP responsiveness. We finally asked whether adrenal-specific complex II was expressed in Y1 10r9 cells by performing EMSA experiments using the −503B nucleotide as a probe (Fig. 6D). As expected, this site retained a complex whose binding was efficiently competed by the −503B or −503A+B site but not by the −458 SFRE or by an antibody raised against SF-1. These binding properties are consistent with complex II being present in Y1 10r9 cells. Strongly arguing for its role in *akr1-b7* promoter cAMP responsiveness, complex II binding is induced (2-fold) by treatment of Y1 10r9 cells with 10^{-5} M forskolin. A similar cAMP-dependent increase in complex II binding (2.1 ± 0.2-fold) was also observed in different nuclear extracts from wild-type Y1 cells (data not shown).

Discussion

The present work was undertaken in an attempt to unravel the role of SFREs in controlling hormonal and cell-specific aspects of gene expression in the adrenals. Using the −510/+41 promoter region of the ACTH-regulated *akr1-b7* scavenger gene as a model, we have identified three SFREs (–102,

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

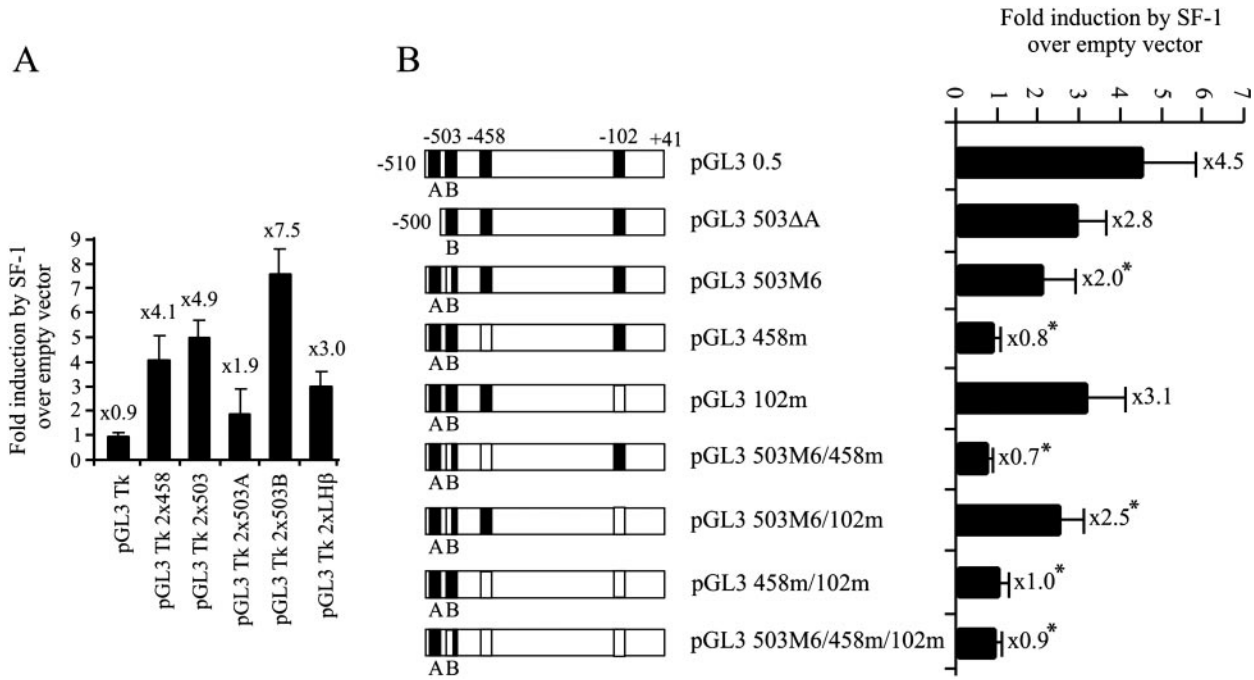


FIG. 4. SF-1 activates SFREs of the *akr1-b7* promoter in heterologous HeLa cells. A, SF-1 differently activates the isolated SFREs. Heterologous HeLa cells were transfected with 1 μg of the dimerized SFRE constructs driving the expression of the luciferase reporter gene through the minimal Tk promoter. The cells were cotransfected for 29 h with 5 ng pSG5-SF-1 expression vector or the corresponding amount of pSG5 empty vector. Results are expressed as induction over the empty vector ± SD, reflecting SF-1 sensitivity. The data are the mean of at least three independent experiments performed in triplicate. Relative luciferase units were corrected to the Renilla activity of a cotransfected expression vector. B, Effect of SFREs mutations on SF-1 induction of the −510/+41 promoter. One microgram of the 0.5-kb wild-type or mutant promoter was transfected in HeLa cells, cotransfected with 5 ng pSG5-SF-1 expression vector or the corresponding amount of pSG5 empty vector for 29 h. Results are expressed as above. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test. *, $P < 0.05$ for induction being significantly different from induction of the wild-type construct.

−458, and −503) and provide functional evidence that these sites have distinct functions to achieve *akr1-b7* promoter activity in adrenocortical cells.

The cryptic SFRE at −102 was previously shown to be activated by SF-1 and is required for basal proximal promoter (–120/+41) activity in Y1 cells (11). The data presented here confirm that the −102 site is implicated only in basal activity, even in the context of the −510/+41 promoter. This is consistent with our recent paper showing that mutation of the −102 SFRE in the −1804/+41 promoter affects only promoter strength but not responsiveness to ACTH in the adrenals of transgenic mice (44). Interestingly, the study of the consequences of this mutation during development has suggested that this site influences promoter sensitivity to postnatal changes in SF-1 levels and thus is required to trigger *akr1-b7* expression after 15 d of age but is dispensable for early expression (44).

Among the three SFREs contained within the −510/+41 promoter, the −458 sequence shows the greatest relative affinity for monomeric SF-1. Its mutation prevents promoter activation by SF-1 in HeLa cells and dominantly and dramatically impairs both basal and cAMP-induced promoter activity in Y1 cells. Indeed when the −458 site is mutated, mutation of any of the two remaining SFREs (–102 or −503) has no additional effect on promoter activity.

The palindromic −503A+B SFRE binds three different complexes: SF-1 as a monomer (complex I) with low affinity, a complex between SF-1 and another protein (SF-1/X, complex III), and an adrenal-specific complex with high affinity (complex II). Importantly, analyses of mutant −503A+B sites have shown that the three complexes recognize partly overlapping sequences, indicating that they interact in a mutually exclusive manner. Deletion of the −503A site, which specifically displaces heteromeric complex III, results in a slight but significant increase in overall *akr1-b7* promoter activity, indicating that the SF-1/X complex might be acting as a repressor or as a transcriptionally silent complex that prevents activating factors binding. Recent papers have described the inhibitory association of SF-1 with DP103 (56) or $P54^{nrb}$/NonO (32). Gel-shift experiments conducted with antibodies directed against DP103 or *in vitro*-translated DP103 (kind gifts of Dr. Grässer) rule out the participation of DP103 in the inhibitory complex (data not shown). A possible interaction between NonO and SF-1 on the *akr1-b7* promoter would need further examination, even though it seems unlikely. Indeed, this complex was not formed with nuclear extracts from Y1 cells on the CYP17 promoter (32), whereas we showed that the SF-1 partner in complex III is present not only in Y1 and mouse adrenal cells but also in steroidogenic Leydig MA-10 cells.

Although deletion of the −503A site leads to a slight increase in basal promoter activity and forskolin sensitivity, deletion of the complete −503A+B site results in a marked decrease in basal activity and forskolin sensitivity, indicating that the major function of the site is to bind an activator of transcription, at least in adrenocortical cells. Interestingly,

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

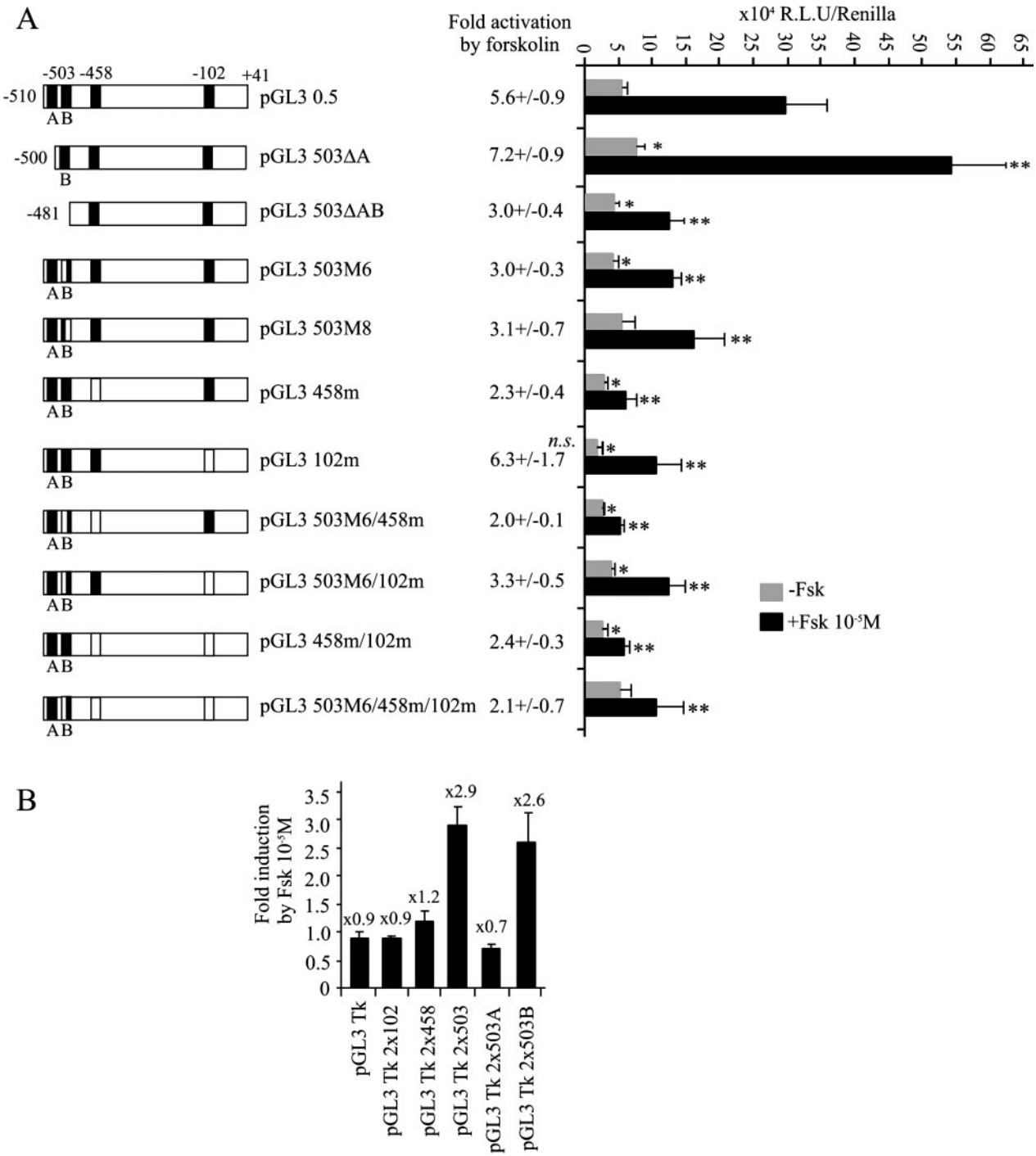


FIG. 5. Role of the SFREs in *akr1-b7* promoter activity in Y1 adrenocortical cells. A, Effect of individual or combined mutations or deletions. The role of the three SFREs in *akr1-b7* promoter activity in Y1 cells that endogenously express AKR1-B7 was evaluated by mutating (*white rectangle*) or deleting the different SFREs in the context of the 0.5-kb promoter (–510/+41), driving the expression of the luciferase reporter gene. Two different mutations were performed in the −503B site (M6 and M8). The ability of the constructs to sense cAMP increases was evaluated by incubating the cells with 10^{-5} M forskolin (Fsk) for 24 h. Results are expressed as the mean of at least three independent experiments performed in triplicate ± SD. Firefly luciferase units were corrected by the activity of a cotransfected Renilla expression vector. Statistical analysis was performed with Student's *t* test. *, Significantly different from 0.5-kb wild-type construct basal level ($P < 0.05$); **, significantly different from 0.5-kb wild-type construct-induced level ($P < 0.05$); when not stated, induction factors are significantly different from wild-type construct factor ($P < 0.05$); *n.s.*, not significantly different from the forskolin induction factor of the wild-type construct ($P > 0.05$). R.L.U., Relative luciferase units. B, cAMP sensitivity of the isolated SFREs. The ability of the different SFREs to mediate cAMP responsiveness when isolated from their promoter context was assessed. The SFREs were dimerized in front of the minimal Tk promoter driving the expression of the luciferase reporter, and the resulting constructs were transfected in Y1 cells, treated or not by 10^{-5} M forskolin for 24 h. Results are expressed as fold induction by forskolin ± SD. Data are the mean of at least three independent experiments performed in triplicate. Relative luciferase units were corrected to the Renilla activity of a cotransfected expression vector.

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

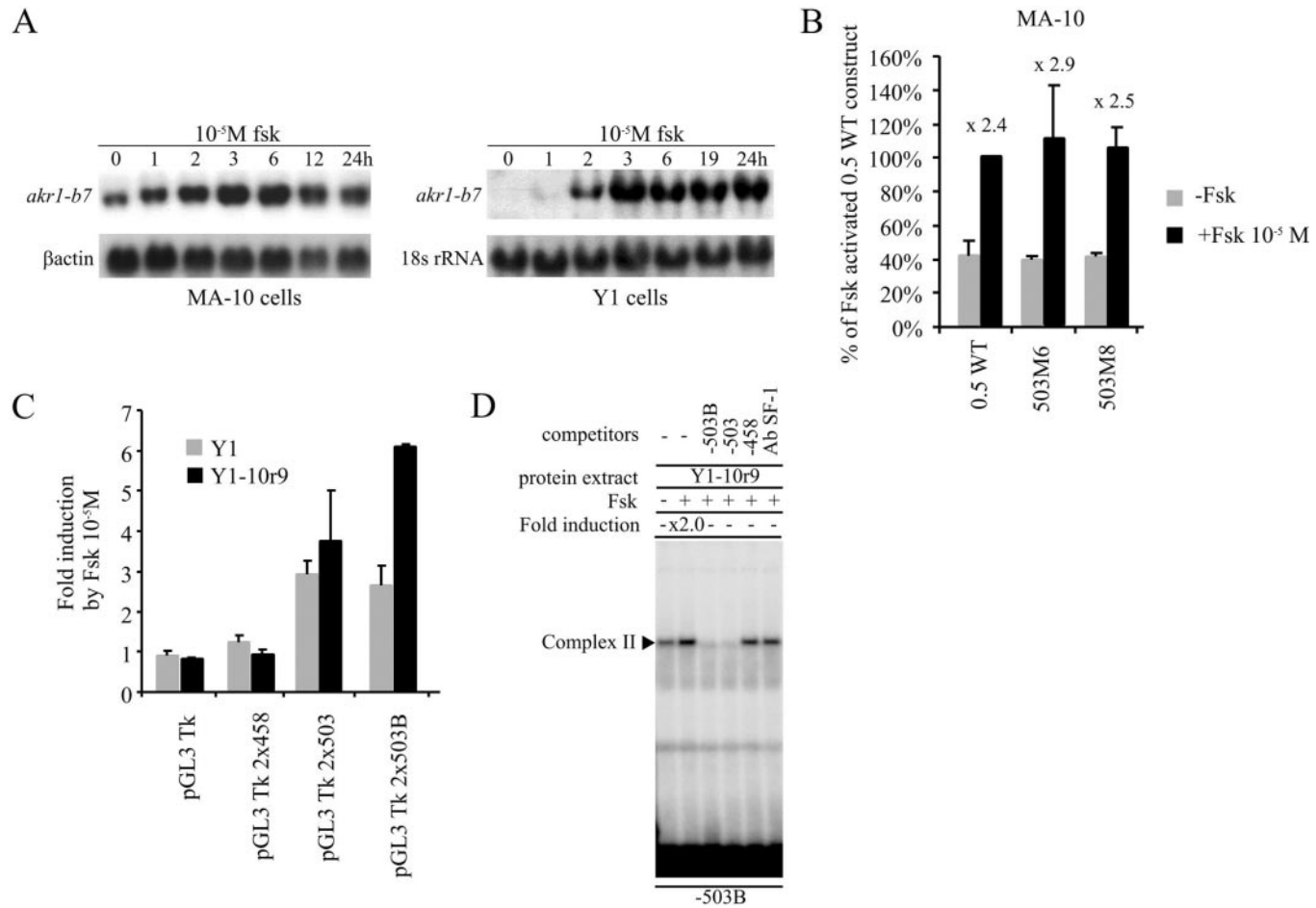


FIG. 6. Adrenal-specific complex II is responsible for −503B half-site activity. A, cAMP sensitivity is markedly impaired in MA-10 cells. To evaluate endogenous *akr1-b7* gene sensitivity to cAMP increases, MA-10 and Y1 cells were cultured for 1, 3, 6, 12 (or 19), and 24 h in the presence of 10^{-5} M forskolin (Fsk). Untreated cells were included as a control. RNAs were extracted using the Trizol reagent, electrophoresed, and blotted to a nylon membrane. The *akr1-b7*, β-actin, or 18S rRNAs were then revealed using complementary ^{32}P-labeled probes. B, In the absence of complex II, −503 half-site B is not functional. To differentiate between the activity of SF-1 and adrenal-specific complex II, MA-10 cells were transfected with either the 0.5-kb wild-type construct or two half-site B mutants (M6 and M8) and treated or not by 10^{-5} M forskolin for 24 h. The results are expressed as mean of three independent experiments performed in triplicate ± SD. Forskolin-activated 0.5-kb wild-type promoter activity was set as 100%. C, Absence of active SF-1 does not preclude −503 site forskolin sensitivity. Y1 10r9 cells that express a nonfunctional SF-1 protein were transfected with the dimerized SFRE constructs, and their ability to respond to forskolin stimulation (10^{-5} M for 24 h) was assayed (*black bars*). Results are expressed as fold induction by forskolin ± SD. Data are the means of at least three independent experiments performed in triplicate. Relative luciferase units were corrected to the Renilla activity of a cotransfected expression vector. Results of similar transfections conducted in Y1 cells (Fig. 5B) were included for comparison (*gray bars*). D, Adrenal-specific complex II binding is stimulated by forskolin in Y1 10r9 cells. Nuclear extracts from Y1 10r9 cells untreated or treated with 10^{-5} M forskolin for 24 h were submitted to EMSA experiments using the −503B half-site as a probe. Binding activity was measured by phosphorimager quantitation.

mutations of the −503B half-site perfectly mimic deletion of the complete −503A+B site, indicating that the activator complex binds to this region. As −503B mutations prevent the binding of both monomeric SF-1 and complex II in EMSA, one might conclude that SF-1 displacement is responsible for the decrease in promoter activity. However, several lines of evidence suggest a prominent role for adrenal-specific complex II. First of all, the −503B site binds adrenal-specific complex II with much more efficiency than monomeric SF-1. Second, in MA-10 cells that express great amounts of active SF-1 but fail to display complex II binding, mutations in the −503B half-site do not affect *akr1-b7* promoter activity. Third, in mutant Y1 10r9 cells that show impaired SF-1 *trans*-acting properties (55) but retain complex II binding activity, the isolated −503B site is still sensitive to cAMP. We can thus conclude that an adrenal-specific factor is required for *akr1-b7* promoter activity in adrenocortical cells. It is tempting to speculate that such a factor might also participate in the adrenal-restricted expression of other steroidogenic enzymes such as CYP21 or CYP11B1. Interestingly, an adrenal-specific factor [adrenal-specific protein (ASP)] has already been implicated in cAMP responsiveness of CYP21. In contrast to our observations, ASP bound Sp1-like GC-rich sequences (57, 58). Surprisingly, although the data presented at the time were rather convincing, ASP has never been isolated or cloned, thus precluding a comparison with our data.

A previous report from our lab has indicated that binding sites for C/EBP (–61) and Sp1 (–52) participate in the control of the proximal *akr1-b7* promoter (–120/+41) by the cAMP pathway (11). Mutation of the −458 SFRE or, to a lesser

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

extent, mutations of the −503B site markedly reduce forskolin sensitivity of the −510/+41 promoter, indicating that the proximal sites are not sufficient for full cAMP responsiveness. Numerous cell transfection experiments have shown that SF-1 could participate in the cAMP responsiveness of several steroidogenic genes promoters (30, 31, 51, 59–63) as well as the high-density lipoprotein receptor SR-BI (64, 65) and the ACTH receptor MC2R (66), although the underlying mechanisms are still contradictory (34, 36, 62, 67–69). Quite surprisingly, given the drastic effect of its mutation on cAMP responsiveness of the −510/+41 promoter, the isolated −458 SFRE is unable to confer forskolin sensitivity to the heterologous minimal Tk promoter in Y1 cells, indicating that SF-1 bound to this site is not intrinsically responsive to cAMP. On the contrary, the isolated −503B (or −503A+B) site is responsive to forskolin, suggesting that adrenal-specific complex II might act as the true sensor of cAMP increases. However, the dominant effect of the −458 SFRE mutation suggests that this complex needs to cooperate with SF-1 to achieve cAMP responsiveness of the *akr1-b7* promoter in adrenocortical cells. This cooperation could involve chromatin remodeling evoked by the binding of SF-1 to the −458 SFRE, increasing accessibility to the adjacent −503B site. Another possibility is that the −458 SFRE recruits specific coactivators in response to −503B site activation by complex II binding. Likely candidates are p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and/or transcription intermediary factor 2 (TIF2), two recently described SF-1 coactivators that may participate in cAMP-mediated activation of the bovine CYP17 cAMP responsive sequence (36). Such a hypothesis will need further demonstration.

In summary, using a nonsteroidogenic gene encoding an ACTH-dependent detoxifying enzyme as an alternative model, we have shown that functionally specialized SFREs act in a coordinate fashion to integrate ACTH/cAMP and cell-specific trans-acting signals. Our results also suggest that, at least in adrenocortical cells, SF-1 has no intrinsic cAMP sensitivity but that it can integrate hormonal responsiveness by cooperating with a *cis*-acting element that binds a tissue-specific factor.

Acknowledgments

We thank Alain Halère for excellent technical assistance, Dr. Enzo Lalli for critical reading of the manuscript, and Dr. Bernard Schimmer for kindly providing mutant Y1–10r9 mutant cells.

Received August 21, 2003. Accepted October 29, 2003.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. Annemarie Lefrançois-Martinez, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique, 6547 Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, Université Blaise Pascal, Clermont II, Complexe Universitaire des Cézeaux, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France. E-mail: a-marie.lefrancois-martinez@geem.univ-bpclermont.fr.

References

1. **DuBois RN, Simpson ER, Kramer RE, Waterman MR** 1981 Induction of synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 by adrenocorticotropin in cultured bovine adrenocortical cells. J Biol Chem 256:7000–7005
2. **Funkenstein B, McCarthy JL, Dus KM, Simpson ER, Waterman MR** 1983 Effect of adrenocorticotropin on steroid 21-hydroxylase synthesis and activity in cultured bovine adrenocortical cells. Increased synthesis in the absence of increased activity. J Biol Chem 258:9398–9405
3. **Kramer RE, Anderson CM, Peterson JA, Simpson ER, Waterman MR** 1982 Adrenodoxin biosynthesis by bovine adrenal cells in monolayer culture. Induction by adrenocorticotropin. J Biol Chem 257:14921–14925
4. **Kramer RE, Simpson ER, Waterman MR** 1983 Steroidogenic refractoriness of bovine adrenocortical cells to dibutyryl cyclic AMP. Steroids 41:207–223
5. **Zuber MX, Simpson ER, Hall PF, Waterman MR** 1985 Effects of adrenocorticotropin on 17 α-hydroxylase activity and cytochrome P-450(17α) synthesis in bovine adrenocortical cells. J Biol Chem 260:1842–1848
6. **Kovanen PT, Goldstein JL, Chappell DA, Brown MS** 1980 Regulation of low density lipoprotein receptors by adrenocorticotropin in the adrenal gland of mice and rats in vivo. J Biol Chem 255:5591–5598
7. **Rigotti A, Edelman ER, Seifert P, Iqbal SN, DeMattos RB, Temel RE, Krieger M, Williams DL** 1996 Regulation by adrenocorticotropic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. J Biol Chem 271:33545–33549
8. **Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV, Waterman MR** 1987 Studies on the synthesis of sterol carrier protein-2 in rat adrenocortical cells in monolayer culture. Regulation by ACTH and dibutyryl cyclic 3′,5′-AMP. J Biol Chem 262:3713–3717
9. **Aigueperse C, Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Jean CI** 1999 Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. J Endocrinol 160:147–154
10. **Chinn AM, Ciais D, Bailly S, Chambaz E, LaMarre J, Feige JJ** 2002 Identification of two novel ACTH-responsive genes encoding manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) and the zinc finger protein TIS11b [tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)-inducible sequence 11b]. Mol Endocrinol 16: 1417–1427
11. **Aigueperse C, Val P, Pacot C, Darne C, Lalli E, Sassone-Corsi P, Veyssiere G, Jean C, Martinez A** 2001 SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. Mol Endocrinol 15:93–111
12. **Ahlgren R, Suske G, Waterman MR, Lund J** 1999 Role of Sp1 in cAMP-dependent transcriptional regulation of the bovine CYP11A gene. J Biol Chem 274:19422–19428
13. **Venepally P, Waterman MR** 1995 Two Sp1-binding sites mediate cAMP-induced transcription of the bovine CYP11A gene through the protein kinase A signaling pathway. J Biol Chem 270:25402–25410
14. **Liu Z, Simpson ER** 1999 Molecular mechanism for cooperation between Sp1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) to regulate bovine CYP11A gene expression. Mol Cell Endocrinol 153:183–196
15. **Mukai K, Mitani F, Agake R, Ishimura Y** 1998 Adrenocorticotropic hormone stimulates CYP11B1 gene transcription through a mechanism involving AP-1 factors. Eur J Biochem 256:190–200
16. **Pena P, Reutens AT, Albanese C, D'Amico M, Watanabe G, Donner A, Shu IW, Williams T, Pestell RG** 1999 Activator protein-2 mediates transcriptional activation of the CYP11A1 gene by interaction with Sp1 rather than binding to DNA. Mol Endocrinol 13:1402–1416
17. **Tremblay JJ, Hamel F, Viger RS** 2002 Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity. Endocrinology 143:3935–3945
18. **Silverman E, Eimerl S, Orly J** 1999 CCAAT enhancer-binding protein β and GATA-4 binding regions within the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in rat ovarian cells. J Biol Chem 274:17987–17996
19. **Zhang P, Mellon SH** 1997 Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. Mol Endocrinol 11:891–904
20. **Morohashi K, Honda S, Inomata Y, Handa H, Omura T** 1992 A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. J Biol Chem 267:17913–17919
21. **Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T** 1993 Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. J Biol Chem 268:7494–7502
22. **Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL** 1994 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. Genes Dev 8:2302–2312
23. **Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, Sasaki H, Osawa Y, Ninomiya Y, Niwa O, Morohashi K, Li E** 1995 Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. Dev Dyn 204:22–29
24. **Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL** 1995 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. Mol Endocrinol 9:478–486
25. **Ramayya MS, Zhou J, Kino T, Segars JH, Bondy CA, Chrousos GP** 1997 Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and *in situ* hybridization studies. J Clin Endocrinol Metab 82:1799–1806
26. **Morohashi K, Tsuboi-Asai H, Matsushita S, Suda M, Nakashima M, Sasano**

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005

H, Hataba Y, Li CL, Fukata J, Irie J, Watanabe T, Nagura H, Li E 1999 Structural and functional abnormalities in the spleen of an mFtz-F1 gene-disrupted mouse. Blood 93:1586–1594
27. **Patel MV, McKay IA, Burrin JM** 2001 Transcriptional regulators of steroidogenesis, DAX-1 and SF-1, are expressed in human skin. J Invest Dermatol 117:1559–1565
28. **Hammer GD, Ingraham HA** 1999 Steroidogenic factor-1: its role in endocrine organ development and differentiation. Front Neuroendocrinol 20:199–223
29. **Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Kallen CB, Strauss 3rd JF** 1997 Multiple steroidogenic factor 1 binding elements in the human steroidogenic acute regulatory protein gene 5′-flanking region are required for maximal promoter activity and cyclic AMP responsiveness. Biochemistry 36:7249–7255.
30. **Hu MC, Hsu NC, Pai CI, Wang CK, Chung B** 2001 Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. Mol Endocrinol 15:812–818
31. **Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE** 2002 Differential regulation of aldosterone synthase and 11β-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. J Mol Endocrinol 28:125–135
32. **Sewer MB, Nguyen VQ, Huang CJ, Tucker PW, Kagawa N, Waterman MR** 2002 Transcriptional activation of human CYP17 in H295R adrenocortical cells depends on complex formation among p54(nrb)/NonO, protein-associated splicing factor, and SF-1, a complex that also participates in repression of transcription. Endocrinology 143:1280–1290
33. **Jacob AL, Lund J** 1998 Mutations in the activation function-2 core domain of steroidogenic factor-1 dominantly suppresses PKA-dependent transactivation of the bovine CYP17 gene. J Biol Chem 273:13391–13394
34. **Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA** 1999 Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. Mol Cell 3:521–526
35. **Aesoy R, Mellgren G, Morohashi K, Lund J** 2002 Activation of cAMP-dependent protein kinase increases the protein level of steroidogenic factor-1. Endocrinology 143:295–303
36. **Borud B, Hoang T, Bakke M, Jacob AL, Lund J, Mellgren G** 2002 The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1. Mol Endocrinol 16:757–773
37. **Sewer MB, Waterman MR** 2002 Adrenocorticotropin/cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate-mediated transcription of the human CYP17 gene in the adrenal cortex is dependent on phosphatase activity. Endocrinology 143:1769–1777
38. **Lefrancois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, Berger M, Daoudal S, Tritsch D, Veyssiere G, Jean C** 1999 Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. J Biol Chem 274:32875–32880
39. **Brockstedt E, Peters-Kottig M, Badock V, Hegele-Hartung C, Lessl M** 2000 Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. Endocrinology 141:2574–2581
40. **Martinez A, Aigueperse C, Val P, Dussault M, Tournaire C, Berger M, Veyssiere G, Jean C, Lefrancois Martinez A** 2001 Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. Chem Biol Interact 130–132:903–917
41. **Val P, Martinez A, Sahut-Barnola I, Jean C, Veyssiere G, Lefrancois-Martinez AM** 2002 A 77-base pair LINE-like sequence elicits androgen-dependent mvdp/akr1–b7 expression in mouse vas deferens, but is dispensable for adrenal expression in rats. Endocrinology 143:3435–3448
42. **Sahut-Barnola I, Lefrancois-Martinez AM, Jean C, Veyssiere G, Martinez A** 2000 Adrenal tumorigenesis targeted by the corticotropin-regulated promoter of the aldo-keto reductase AKR1B7 gene in transgenic mice. Endocr Res 26: 885–898
43. **Martinez A, Lefrancois-Martinez AM, Manin M, Guyot S, Jean-Faucher C, Veyssiere G, Kahn A, Jean C** 1999 5′-Flanking and intragenic sequences confer androgenic and developmental regulation of mouse aldose reductase-like gene in vas deferens and adrenal in transgenic mice. Endocrinology 140:1338–1348
44. **Martinez A, Val P, Sahut-Barnola I, Aigueperse C, Veyssiere G, Lefrancois-Martinez AM** 2003 SF-1 controls the aldose reductase akr1b7 gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site. Endocrinology 144:2111–2120
45. **Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P** 1998 Multiple parameters determine the specificity of transcriptional response by nuclear receptors HNF-4, ARP-1, PPAR, RAR and RXR through common response elements. Nucleic Acids Res 26: 2491–2499
46. **Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ** 1997 CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. Cell 88:405–415
47. **Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J** 1991 Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. Science 252:1296–1300
48. **Rice DA, Mouw AR, Bogerd AM, Parker KL** 1991 A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. Mol Endocrinol 5:1552–1561
49. **Drevet JR, Lareyre JJ, Schwaab V, Vernet P, Dufaure JP** 1998 The PEA3 protein and Ets oncogene family is a putative transcriptional modulator of the mouse epididymis-specific glutathione peroxidase gene gpx5. Mol Reprod Dev 49:131–140
50. **Mangelsdorf DJ, Evans RM** 1995 The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell 83:841–850
51. **Bakke M, Lund J** 1995 Mutually exclusive interactions of two nuclear orphan receptors determine activity of a cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate-responsive sequence in the bovine CYP17 gene. Mol Endocrinol 9:327–339
52. **Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, Parker KL** 1993 The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. Mol Cell Biol 13:861–868
53. **Fernandez PM, Brunel F, Jimenez MA, Saez JM, Cereghini S, Zakin MM** 2000 Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Endocrinology 141:2392–2400
54. **Baron S, Manin M, Aigueperse C, Berger M, Jean C, Veyssiere G, Morel L** 2003 Hormonal and developmental regulation of the mouse aldose-reductase-like gene akr1b7 expression in Leydig cells. J Mol Endocrinol 31:71–81
55. **Frigeri C, Tsao J, Czerwinski W, Schimmer BP** 2000 Impaired steroidogenic factor 1 (NR5A1) activity in mutant Y1 mouse adrenocortical tumor cells. Mol Endocrinol 14:535–544
56. **Ou Q, Mouillet JF, Yan X, Dorn C, Crawford PA, Sadovsky Y** 2001 The DEAD box protein DP103 is a regulator of steroidogenic factor-1. Mol Endocrinol 15:69–79
57. **Kagawa N, Waterman MR** 1991 Evidence that an adrenal-specific nuclear protein regulates the cAMP responsiveness of the human CYP21B (P450C21) gene. J Biol Chem 266:11199–11204
58. **Kagawa N, Waterman MR** 1992 Purification and characterization of a transcription factor which appears to regulate cAMP responsiveness of the human CYP21B gene. J Biol Chem 267:25213–25219
59. **Brand C, Nury D, Chambaz EM, Feige JJ, Bailly S** 2000 Transcriptional regulation of the gene encoding the StAR protein in the human adrenocortical cell line, H295R by cAMP and TGFβ1. Endocr Res 26:1045–1053
60. **Liu Z, Simpson ER** 1997 Steroidogenic factor 1 (SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. Mol Endocrinol 11:127–137
61. **Takayama K, Morohashi K, Honda S, Hara N, Omura T** 1994 Contribution of Ad4BP, a steroidogenic cell-specific transcription factor, to regulation of the human CYP11A and bovine CYP11B genes through their distal promoters. J Biochem (Tokyo) 116:193–203
62. **Sewer MB, Waterman MR** 2002 cAMP-dependent protein kinase (PKA) enhances CYP17 transcription via MKP-1 activation in H295R human adrenocortical cells. J Biol Chem 27:27
63. **Carlone DL, Richards JS** 1997 Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3′,5′-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. Mol Endocrinol 11:292–304
64. **Lopez D, Nackley AC, Shea-Eaton W, Xue J, Schimmer BP, McLean MP** 2001 Effects of mutating different steroidogenic factor-1 protein regions on gene regulation. Endocrine 14:353–362
65. **Lopez D, Sandhoff TW, McLean MP** 1999 Steroidogenic factor-1 mediates cyclic 3′,5′-adenosine monophosphate regulation of the high density lipoprotein receptor. Endocrinology 140:3034–3044
66. **Naville D, Penhoat A, Durand P, Begeot M** 1999 Three steroidogenic factor-1 binding elements are required for constitutive and cAMP-regulated expression of the human adrenocorticotropin receptor gene. Biochem Biophys Res Commun 255:28–33
67. **Desclozeaux M, Krylova IN, Horn F, Fletterick RJ, Ingraham HA** 2002 Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. Mol Cell Biol 22:7193–7203
68. **Jones PM, Sayed SB, Persaud SJ, Burns CJ, Gyles S, Whitehouse BJ** 2000 Cyclic AMP-induced expression of steroidogenic acute regulatory protein is dependent upon phosphoprotein phosphatase activities. J Mol Endocrinol 24:233–239
69. **Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM** 2001 ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. J Biol Chem 276:34888–34895

***Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (http://www.endo-society.org), the foremost professional society serving the endocrine community.**

Downloaded from endo.endojournals.org on July 19, 2005